

UNIVERSITAT DE VALENCIA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA



DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO “OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA II” 537:290 F

**ESTIMULACIÓN OVÁRICA Y SUS VARIANTES Y SU EFECTO SOBRE LA
CALIDAD EMBRIONARIA; ANÁLISIS MORFOCINÉTICO MEDIANTE
CINEMATOGRAFÍA.**

Tesis Doctoral presentada por:
Manuel Alberto Muñoz Cantero
Licenciado en Medicina y Cirugía,
Para aspirar al grado de Doctor.

Bajo la dirección de los doctores:
José Alejandro Remohí Giménez
Nicolás Garrido Puchalt
Marcos Meseguer Escrivá

José Alejandro REMOHÍ GIMÉNEZ, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático del Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA: Que, don Manuel Alberto Muñoz Cantero ha realizado bajo mi dirección el trabajo para su Tesis Doctoral “Estimulación ovárica y sus variantes y su efecto sobre la calidad embrionaria; análisis morfocinético mediante cinematografía”. Revisado el presente trabajo, se encuentra conforme para ser presentado en la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado,
En Valencia a 1 de Marzo de 2012

Nicolás GARRIDO PUCHALT, Doctor en Biología por la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA: Que, don Manuel Alberto Muñoz Cantero ha realizado bajo mi dirección el trabajo para su Tesis Doctoral “Estimulación ovárica y sus variantes y su efecto sobre la calidad embrionaria; análisis morfocinético mediante cinematografía”. Revisado el presente trabajo, se encuentra conforme para ser presentado en la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado,
En Valencia a 1 de Marzo de 2012

Marcos MESEGUER ESCRIVÁ, Doctor Europeo en Biología por la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA: Que, don Manuel Alberto Muñoz Cantero ha realizado bajo mi dirección el trabajo para su Tesis Doctoral “Estimulación ovárica y sus variantes y su efecto sobre la calidad embrionaria; análisis morfocinético mediante cinematografía”. Revisado el presente trabajo, se encuentra conforme para ser presentado en la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado,
En Valencia a 1 de Marzo de 2012

Estimulación Ovárica y sus Variantes y su
Efecto Sobre la Calidad Embrionaria;
Análisis Morfocinético Mediante
Cinematografía.

Manuel Muñoz Cantero

INTRODUCCIÓN

- 1.- Infertilidad y tratamientos de Reproducción Asistida.
- 2.- Programas de donación de ovocitos.
 - 2.1.- Pautas de estimulación ovárica de la donante.
 - 2.1.1.- Bases fisiológicas de los análogos de la GnRH.
 - 2.1.2.- Gonadotropinas y Reproducción Asistida.
 - 2.1.3.- Agentes desencadenantes de la ovulación.
 - 2.2.- Protocolos de preparación endometrial en la receptora.
 - 2.3 Sincronización del ciclo donante-receptora.
 - 2.4 Resultados de los programas de donación de ovocitos.
- 3.- Limitaciones de las técnicas de Reproducción Asistida. Necesidad de mejoras.
- 4.- Influencia de los protocolos de estimulación ovárica sobre el desarrollo embrionario.
- 5.- Marcadores de calidad embrionaria.
 - 5.1.- Marcadores clásicos.
 - 5.2.- Nuevos marcadores.
- 6.- Análisis de imagen. Aplicaciones en Embriología.
- 7.- Time-lapse y cinética de desarrollo embrionario.

OBJETIVOS

MATERIAL Y METODO

- 1.- Donación de ovocitos.
 - 1.1.- Selección de las donantes.
 - 1.1.1.- Consentimiento informado
 - 1.1.2.- Protocolos de estimulación.
 - 1.2.- Receptoras
 - 1.2.1.- Preparación endometrial.
 - 1.2.2.- Administración de progesterona.

- 1.2.3.- Duración de la fase estrogénica.
 - 1.2.4.- Controles durante la fase estrogénica.
 - 1.2.5.- Sangrado durante la fase estrogénica.
- 1.3.- Sincronización del ciclo donante-receptora
 - 1.3.1.- Donantes
 - 1.3.2.- Receptoras.
- 2.- Punción ovárica y recuperación de ovocitos.
- 3.- Obtención y procesamiento de las muestras de semen.
- 4.- Técnicas de fecundación *in vitro*.
 - 4.1.- Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).
- 5.- Análisis de la fecundación y valoración del desarrollo embrionario.
- 6.- Transferencia embrionaria.
- 7.- Sistemas de análisis de imagen. El Embryoscope.
 - 7.1.- Placas para el Embryoscope: Embryoslides™.
 - 7.2.- Preparación Embryoslides™.
 - 7.3.- EmbryoViewer.
 - 7.4.- El Embryoscope en el laboratorio de FIV.
- 8.- Variables y grupos de estudio.
 - 8.1.- Variables independientes.
 - 8.2.- Variables dependientes.
- 9.- Análisis estadístico.

RESULTADOS

- 1.- Influencia de los protocolos de estimulación sobre la cinética de desarrollo embrionario.
 - 1.1.- Cinética embrionaria en función del tipo de protocolo empleado.
 - 1.2.- Rangos de tiempo y porcentaje de embriones óptimos.
 - 1.3.- Distribución embrionaria y categorías morfocinéticas.
 - 1.4.- Resultados reproductivos en función del protocolo de estimulación.
- 2. Efecto del tipo de gonadotropina sobre la cinética de desarrollo embrionario.
 - 2.1.- Cinética de desarrollo embrionario en función del tipo de gonadotropina.

- 2.2.- Rangos de tiempo y porcentaje de embriones óptimos.
- 2.3.- Distribución embrionaria y categorías morfocinéticas.
- 2.4.- Resultados reproductivos en función del tipo de gonadotropina.
- 3.-Influencia de la dosis de gonadotropinas y de la concentración de hormonas esteroideas sobre el desarrollo embrionario
 - 3.1.- Dosis de gonadotropinas
 - 3.1.1 Efecto de la dosis de gonadotropinas sobre la cinética de desarrollo embrionario.
 - 3.1.2.- Rangos de tiempo y porcentaje de embriones óptimos.
 - 3.1.3.- Distribución embrionaria y categorías morfocinéticas.
 - 3.1.4. Resultados reproductivos en función de las dosis de gonadotropinas.
 - 3.2.- Concentraciones de estradiol el día de la inducción de la ovulación.
 - 3.2.1. Efecto de las concentraciones de estradiol sobre la cinética de desarrollo embrionario.
 - 3.2.2.- Rangos de tiempo y porcentaje de embriones óptimos.
 - 3.2.3.- Distribución embrionaria y categorías morfocinéticas.
 - 3.2.4.- Resultados reproductivos en función de las concentraciones séricas de estradiol.
 - 3.3.- Concentraciones de progesterona el día de la inducción de la ovulación.
 - 3.3.1. Efecto de las concentraciones séricas de progesterona sobre la cinética de desarrollo embrionario.
 - 3.3.2.- Rangos de tiempo y porcentaje de embriones óptimos.
 - 3.3.3.- Distribución embrionaria y categorías morfocinéticas.
 - 3.3.4.- Resultados reproductivos en función de las concentraciones séricas de progesterona.

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA.

INTRODUCCIÓN

1. Infertilidad y tratamientos de Reproducción Asistida.

Definida como la incapacidad de conseguir una gestación después de un tiempo razonable (un año) de mantener relaciones sexuales sin medidas anticonceptivas, la infertilidad es una condición que afecta al 15-20% de parejas en edad reproductiva (McDonald 2004).

En sí misma, implica una deficiencia que no compromete la integridad física del individuo ni amenaza su vida aunque puede tener un impacto negativo sobre su desarrollo psicológico que se traduce en una serie de consecuencias psico-sociales que afectan seriamente a la pareja. En los países en vías de desarrollo, las tasas de infertilidad son relativamente bajas en comparación con los países desarrollados debido fundamentalmente a los matrimonios y a la maternidad a edades muy tempranas; este escenario cambia radicalmente en el caso de la infertilidad secundaria, en la que las enfermedades de transmisión sexual y las dificultades para acceder a un servicio sanitario adecuado actúan como causas responsables de los índices de infertilidad en los países subdesarrollados (Lunenfeld et al. 2004).

El siglo XX se ha caracterizado por un creciente control de la fecundidad, es decir, son los individuos los que deciden o no tener hijos y también son cada vez más las ocasiones en que pueden satisfacer este propósito. El desarrollo de los métodos anticonceptivos permite aplazar las gestaciones hasta el momento en el que se desee, mientras es cada vez más fiable. Al mismo tiempo, el aplazamiento de la maternidad deriva en una tendencia creciente de mujeres o parejas con dificultades para concebir o para llevar un embarazo a término (Magda Teresa Ruiz-Salguero 2001) .

En las sociedades modernas, se describen una serie de factores demográficos y sociales representativos de la actual epidemiología de la infertilidad entre los que destacan el mencionado retraso en la maternidad y la influencia negativa sobre la fertilidad de la exposición a tóxicos, hábitos de vida, etc. Esto se traduce en un aumento de la demanda de tratamientos, en el desarrollo y puesta a punto de nuevos protocolos y técnicas, en un crecimiento espectacular de la formación de personal especializado y en

nuevas opciones de tratamiento que generan un impacto mediático importante, hechos que asociados a los resultados médicos obtenidos, suponen una mayor difusión en los medios de comunicación, así como en un incremento de los dilemas legales y éticos de estos servicios.

La infertilidad está considerada como un problema de carácter público que repercute sobre los servicios sociales y sanitarios del país. La gestión de la infertilidad supone para la Medicina una labor considerable, por las dificultades que entraña su diagnóstico y el tratamiento de los desórdenes reproductivos de cada miembro de la pareja. Además, es importante que la pareja reciba información realista sobre las posibilidades que tienen de tener un hijo así como de los riesgos y costes del tratamiento y de sus posibles alternativas (Kamel 2010).

La concesión del premio Nobel de Medicina 2010 a Robert G. Edwards, pionero que revolucionó el tratamiento de la esterilidad a través del desarrollo de la fecundación *in vitro*, supone un reconocimiento global a este campo de la biomedicina y en consecuencia un sello de prestigio e importancia a esta nueva especialidad médico-biológica.

Frente a la infertilidad, históricamente se han desarrollado diferentes técnicas de reproducción asistida, en función del motivo primario por el cual una pareja no puede concebir. En cuanto a las estrategias terapéuticas, el rápido avance experimentado por la Medicina Reproductiva y la experiencia obtenida en el tratamiento de la infertilidad permite el desarrollo de una amplia variedad de alternativas disponibles para las parejas infértiles, que pueden ser agrupadas en tres categorías: tratamiento farmacológico, quirúrgico y los tratamientos de Reproducción Asistida (Brinsden et al. 1998).

Una de las primeras técnicas de Reproducción Asistida desarrolladas para el tratamiento de una pareja infértil es la inseminación artificial, la cual se recomienda siempre y cuando se cumplan dos condiciones indispensables, como es el diagnóstico de trompas permeables y un recuento de espermatozoides móviles progresivos superior a los 2 millones post-capacitación (OMS, 2010). Además, se valoran otros factores como la edad de la paciente, reserva ovárica y tiempo de esterilidad de la pareja o si se han realizado inseminaciones en ciclos anteriores. Desde el punto de vista del factor masculino y dependiendo del origen del semen, la inseminación artificial puede ser

homologa (IAH) o con semen de donante (IAD). En cuanto a los resultados globales obtenidos mediante esta técnica, las tasas de embarazo oscilan entre un 5 y un 70% por paciente, aunque en general se acepta una tasa de embarazo por ciclo de un 10-20% para todo tipo de etiologías (Antman et al. 2002).

Los intentos para lograr la fecundación *in vitro* (FIV) en humanos pasaron por varias etapas de investigación. Actualmente, se considera la técnica hegemónica y precursora de otros procedimientos de reproducción asistida más complejos; consiste en la fecundación del ovocito en condiciones de cultivo *in vitro*, previa obtención y preparación de los gametos para la posterior transferencia de los embriones a la cavidad uterina. La FIV se instaura como tratamiento de la infertilidad asociada a patología tubárica bilateral, pero tiene más indicaciones como la esterilidad por factor masculino no grave, fallos de inseminación artificial, disfunción ovárica y endometriosis. (Ruiz et al. 1996).

La década posterior al desarrollo de la fecundación *in vitro* supone la aparición de numerosas variantes de la técnica, que desembocan en la puesta a punto de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) la cual consiste en la microinyección de un espermatozoide en el interior de un ovocito previamente decumulado (Palermo et al. 1992) y que representa aproximadamente el 40% de los procedimientos efectuados en el laboratorio de fecundación *in vitro*. El ICSI ha revolucionado el tratamiento de la infertilidad masculina, logrando gestaciones incluso en casos de muy mal pronóstico con otras técnicas, y junto con las mejoras en los métodos de cultivo y en las condiciones del laboratorio ha permitido la obtención de embriones de buena calidad con elevado potencial de implantación. Aunque en un principio la práctica del ICSI creció exponencialmente, actualmente ambas técnicas presentan indicaciones clínicas muy concretas de aplicación.

En el siglo XXI resulta evidente la influencia de los avances genéticos en la medicina reproductiva. La posibilidad de transferir embriones libres de anomalías génicas y cromosómicas ha reducido notablemente los riesgos de transmisión de enfermedades hereditarias, mientras que la tecnología asociada a los inmunoensayos ha aportado una visión detallada de los procesos celulares implicados en la expresión génica. Sin embargo, estos avances -así como la capacidad ampliamente difundida de seleccionar los

embriones en función del sexo y de las características genéticas-, han aumentado la preocupación sobre “los niños de diseño” y sobre cierta posibilidad de eugenesia social.

Por último, destacar las técnicas de criopreservación tanto en ovocitos como en embriones. Un buen programa de congelación es fundamental para maximizar las tasas acumuladas de gestación por ciclo estimulado. El avance experimentado en los últimos años con la vitrificación, junto con las mejoras introducidas en los laboratorios se refleja en el mayor rendimiento de embriones de buena calidad, lo que permite al embriólogo optimizar sus criterios de selección y reducir el número de embriones transferidos. Los resultados obtenidos con embriones congelados son cada vez más similares a los de embriones frescos, por lo que los programas de congelación se convierten en una alternativa válida para rentabilizar los ciclos de estimulación ovárica a través de las transferencias de embriones congelados.

2. Programas de donación de ovocitos

El cambio socio-cultural que ha experimentado el mundo en las ultimas décadas ha desembocado en un cambio notable en el deseo gestacional de la mujer. Situaciones como la incorporación al mundo laboral y/o universitario se traducen, entre otras muchas cosas, en que muchas de ellas posponen su maternidad. Sin embargo, la realidad es que la fertilidad disminuye con la edad. Faddy (Faddy et al. 1992) demuestra como la reserva ovárica disminuye con el paso del tiempo, para situar alrededor de los 37-38 años un evidente declive de la fertilidad.

La relativa inaccesibilidad de los gametos femeninos y la dificultad para sincronizar el proceso ovulatorio de la donante y el desarrollo endometrial de la receptora, han determinado un retraso de casi un siglo en la consecución de una gestación con óvulos donados; sin embargo, el desarrollo de la fecundación *in vitro* junto con la amplia y rápida difusión de este procedimiento, ha permitido el avance vertiginoso de esta técnica en las dos últimas décadas. Su aplicación se ha constituido no sólo en la solución para parejas que de otra forma no hubieran logrado una gestación, sino también en un modelo de referencia para una mejor comprensión de los mecanismos fisiológicos involucrados en otras técnicas reproductivas. En estos programas, la posibilidad de homogeneizar el factor femenino actúa como una potente herramienta de discriminación

para el estudio de la influencia real de otros factores como el espermatozoide y la endometriosis (Simon et al. 1994) ya que se reduce la variabilidad en la calidad ovocitaria introducida por la propia situación de infertilidad.

Desde que el equipo australiano de Trounson y Wood (Trounson et al. 1983) comunicó el primer éxito con óvulos donados hace ya más de 20 años, la técnica no ha hecho más que crecer y mejorar sus resultados a pesar de las dificultades inherentes al propio programa de donación de ovocitos, a las distintas leyes en diferentes países, a la dificultad para seleccionar donantes adecuadas y al concepto límite de “compensación económica”.

Inicialmente las indicaciones para la donación de ovocitos incluían el fallo ovárico prematuro y la presencia de alteraciones genéticas y/o cromosómicas, pero en la actualidad, los excelentes resultados obtenidos con esta estrategia de tratamiento han permitido la ampliación de sus indicaciones en beneficio de un colectivo de mujeres cada vez mayor. Las principales causas por las que se recurre a la donación de ovocitos son fallo ovárico precoz, menopausia, fallo ovárico tras tratamiento oncológico, disgenesias gonadales, alteraciones genéticas, fallo repetido de FIV por mala calidad ovocitaria, edad, baja respuesta y ovarios inaccesibles (Budak et al. 2007).

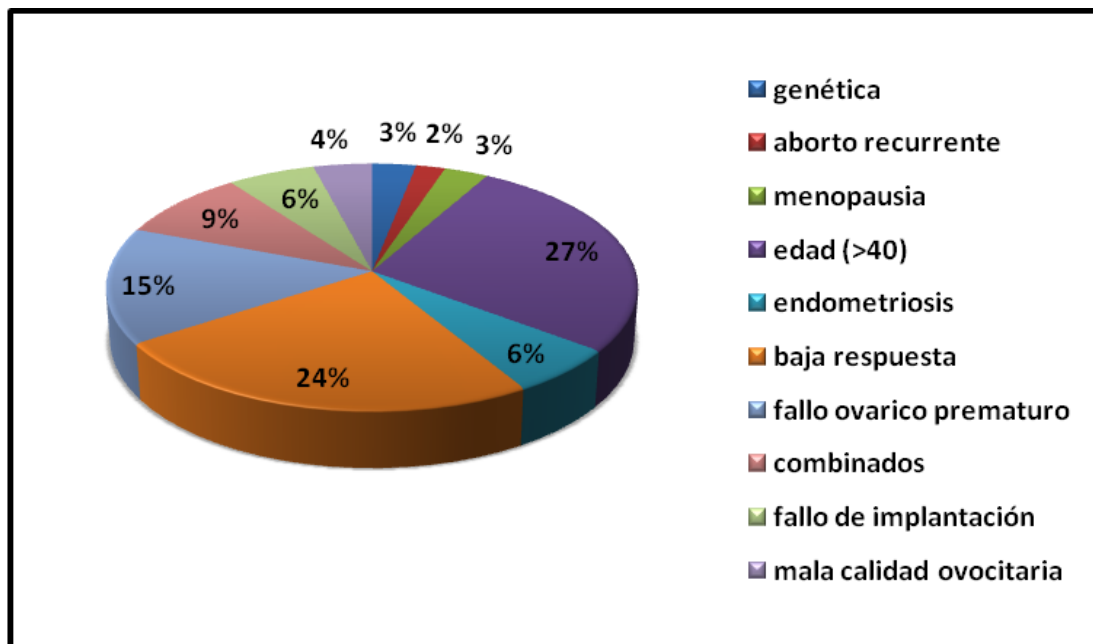


Figura 1. Indicaciones para la donación de ovocitos (Budak et al. 2007)

La Ley española de técnicas de reproducción asistida (14/2006) señala que la donación de ovocitos debe ser anónima y nunca tendrá un carácter lucrativo o comercial. La donante debe tener entre 18-35 años, su estado psicofísico deberá cumplir los términos de un protocolo obligatorio de estudio de las donantes, que tendrá carácter general y que incluirá las características fenotípicas de la donante, además de ser no portadora de enfermedades genéticas, hereditarias o infecciosas transmisibles; también es importante llevar a cabo una evaluación psicológica para comprobar que presenta un perfil idóneo como donante. Los centros autorizados deberán controlar que de una misma donante no nazcan más de 6 hijos dentro del territorio nacional, además de intentar garantizar la máxima similitud fenotípica, inmunológica y de compatibilidad sanguínea con la receptora. Las donantes de ovocitos deberán firmar un documento aportado por el centro, en el que constarán los objetivos y las consecuencias de la donación, así como las pruebas a las que serán sometidas.

2.1 Pautas de estimulación ovárica de la donante

Los tratamientos farmacológicos que restauran o modifican desde un punto de vista terapéutico los procesos ovulatorios se han utilizado para tratar, en las últimas décadas, trastornos relacionados con desórdenes del ciclo menstrual y condiciones de infertilidad. Con algunas notables excepciones, el discurso teórico de estos tratamientos sigue basándose en la capacidad de estos fármacos de superar e interrumpir los mecanismos de control hormonal de un ciclo natural para forzar al ovario a producir uno o más folículos y en consecuencia más ovocitos competentes desde un punto de vista reproductivo. El empleo de estrategias terapéuticas novedosas que simulan cada vez con mayor exactitud la dinámica hormonal de los ciclos naturales ha desembocado en un control cada vez mayor de la folículogénesis.

El hecho de que la estimulación genere una mayor cantidad de ovocitos resuelve problemas derivados de la maduración ovocitaria, la fecundación *in vitro*, el cultivo embrionario, la selección en el momento de la transferencia embrionaria y el proceso de implantación, siendo una de las condiciones más ventajosas de la aplicación de estos

protocolos de estimulación, la posibilidad de congelar embriones supernumerarios, cuya posterior transferencia puede mejorar las tasas de gestación acumulada sin necesidad de volver a estimular al ovario.

2.1.1 Bases fisiológicas de los análogos de la GnRH

Los primeros indicios del carácter endocrino del eje hipofisario-gonadal surgen a principios del siglo XX, cuando se observa que las lesiones localizadas en la hipófisis anterior derivan en atrofia genital. La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) se secreta desde el hipotálamo y actúa sobre las células gonadotropas hipofisarias induciendo la síntesis y liberación de hormona folículo-estimulante (FSH) y de hormona luteinizante (LH); además de esta función fisiológica, estudios recientes sugieren el posible papel de la GnRH como factor local de carácter autocrino/endocrino con efectos en el ovario regulando la esteroidogénesis, la proliferación celular y la apoptosis (Macklon et al. 2006).

- agonistas de la GnRH. Los primeros protocolos de estimulación ovárica en un tratamiento de fecundación *in vitro* se basaban en un protocolo estándar que utilizaba citrato de clomifeno y gonadotropina menopáusica humana (HMG) para conseguir un desarrollo folicular múltiple; este tipo de estimulación provocaba elevadas concentraciones de progesterona en la fase folicular tardía y en consecuencia, un riesgo de inducir un pico prematuro de LH, lo que suponía cancelar un 20-25% de los ciclos, ya que la exposición anticipada a la hormona conduce a una atresia folicular masiva y/o a unos resultados del ciclo claramente comprometidos (Hayden 2008).

Con el propósito de prevenir la aparición de un pico prematuro de LH y por tanto, reducir las tasas de cancelación se desarrollan los agonistas de la GnRH (a-GnRH), cuya administración continuada genera un aumento transitorio de la función gonadal y un descenso significativo de los esteroides sexuales; aunque la acción inicial del agonista es la activación de la función hipofisaria, la ocupación en el tiempo de los receptores correspondientes conduce a la desensibilización de la hipófisis que en última instancia provoca un descenso en los niveles de FSH y LH (Leyendecker et al. 1980). Los agonistas de la GnRH suprimen completamente la liberación de gonadotropinas

endógenas durante los protocolos de estimulación ovárica, lo que en definitiva reduce las tasas de cancelación y mejora los resultados de los tratamientos de reproducción.

Una vez que se demuestra el considerable impacto de estos fármacos en los resultados de los programas de fecundación, el esfuerzo se centra en optimizar sus efectos mediante el desarrollo de distintos protocolos de estimulación.

a) protocolo largo. El tratamiento se inicia en la fase lútea del ciclo anterior y se continúa hasta la administración de la hCG. Debido a las propias características del compuesto, la supresión de la hipófisis viene precedida de una fase de estimulación conocida con el término anglosajón de “flare up” responsable de la duración del protocolo, ya que no se puede iniciar la estimulación del ovario hasta que la hipófisis no esté completamente bloqueada, lo que ocurre aproximadamente diez días después (Barbieri and Hornstein 1999). Entre las ventajas de este procedimiento destaca la contribución a facilitar la planificación del ciclo, ya que es posible retrasar el inicio del tratamiento con gonadotropinas exógenas sin que se alteren los resultados aunque no se puede descartar con total seguridad la posible presencia de gestaciones espontáneas en el momento de iniciarse el tratamiento si no se tomaron anticonceptivos orales (ACOs) previamente.

b) protocolo corto. Combina la acción de los agonistas y de las gonadotropinas endógenas. El a-GnRH actúa como estímulo inicial para el reclutamiento folicular, alcanzándose la maduración folicular en unos 12 días, tiempo más que suficiente para desensibilizar la hipófisis y prevenir el pico prematuro de LH (Huirne et al. 2004). La desventaja más importante de este protocolo son los elevados niveles de progesterona que se detectan al principio de la fase folicular, posiblemente como consecuencia del rescate del cuerpo lúteo precedente.

- antagonistas de la GnRH. Esta variante de los análogos de la GnRH impide la aparición de un pico prematuro de LH mediante la supresión inmediata de la función hipofisaria; este bloqueo y la posibilidad de revertirlo hacen de los antagonistas de la GnRH (an-GnRH) unos fármacos especialmente apropiados para su uso a corto plazo en los programas de fecundación *in vitro*.

Al contrario que los agonistas, los antagonistas de la GnRH compiten directamente con la GnRH endógena para unirse al receptor e inhibir, casi de forma

instantánea, la secreción de gonadotropinas y hormonas esteroideas. El grado y supresión de la función hipofisaria es dosis-dependiente, afectando especialmente a la LH, de modo que cualquier residuo de gonadotropinas endógenas detectado después de la administración del antagonista a dosis máximas sugiere un bloqueo incompleto de los receptores hipofisarios o la presencia de una secreción gonadatrópica no dependiente de GnRH (Huirne and Lambalk 2001).

Las ventajas derivadas de trabajar con antagonistas de la GnRH implican un bloqueo casi inmediato de la hipófisis, no están asociados a estimulaciones agresivas con gonadotropinas, se evita la formación de quistes foliculares, presentan menos efectos secundarios, se evita la administración inadecuada del análogo en caso de gestación inadvertida y se reduce la cantidad de gonadotropinas exógenas al mismo tiempo que se acortan los tiempos de los protocolos y disminuye el coste económico de la estimulación.

Los antagonistas pueden administrarse en cualquier momento durante el principio-mitad de la fase folicular. Su inclusión en los protocolos de estimulación ovárica adopta numerosas variantes:

a) dosis única vs dosis múltiple. En el protocolo de dosis única, la administración de 3 mg del an-GnRH en torno al día 7 de estimulación impide la aparición de un pico prematuro de LH (Olivennes et al. 1998) con la ventaja de que se necesitan menos inyecciones, y el posible inconveniente de que no sólo inhibe el pico de LH sino que puede causar una supresión excesiva y potencialmente dañina de la propia hormona luteinizante. Por su parte, el protocolo de dosis múltiple supone la administración diaria del an-GnRH desde el día 5-6 de estimulación hasta el momento en el que se desencadena la ovulación, con una dosis mínima consensuada que previene el pico de LH de 0.25 mg/día (Albano et al. 1997).

b) administración fija vs flexible. Se fija el día 6 de estimulación como punto de partida para comenzar el tratamiento con los antagonistas aunque esta elección no se basa en evidencias experimentales ya que en un principio, el antagonista debería introducirse con la presencia de desarrollo folicular y/o con la síntesis de estradiol (E_2) por parte de los folículos en desarrollo. Por lo tanto, la idea de una incorporación flexible del antagonista conduce a la optimización del protocolo (Tarlitzis et al. 2006).

La posibilidad de planificar los ciclos de tratamiento introducida por los protocolos de estimulación con análogos de la GnRH se ve reforzada gracias al pre-tratamiento con anticonceptivos orales. Este hecho es especialmente importante en el caso de los antagonistas de la GnRH, ya que el inicio de la estimulación depende del momento en el que se inicie la menstruación (Kolibianakis et al. 2006).



Figura 2. Mecanismos de acción de los análogos de la GnRH.

2.1.2 Gonadotropinas y Reproducción Asistida

La estimulación ovárica de carácter farmacológico tiene un papel fundamental en la Medicina Reproductiva y se ha usado tanto en mujeres anovulatorias como en la inducción del desarrollo folicular múltiple necesario para aplicar las técnicas de reproducción asistida (TRA). Actualmente, las gonadotropinas son la herramienta más importante para estimular al ovario en numerosos casos, incluyendo las TRA y desórdenes anovulatorios como el hipogonadismo hipogonadotrópico y la disfunción hipotálamo-hipofisaria.

La administración diaria de los preparados gonadotrópicos es la responsable de mantener el crecimiento de múltiples folículos antrales. Inicialmente, estas preparaciones contenían HMG que posteriormente evolucionaron hacia FSH urinaria (uFSH) y más recientemente hacia FSH y LH recombinante (rFSH y rLH); la incorporación más

reciente a este grupo de fármacos la constituye la corifolitropina alfa con un sistema de liberación retardado de rFSH (Devroey et al. 2009).

Aunque tanto la LH como la FSH son necesarias para un desarrollo folicular normal y una adecuada esteroidogénesis, la FSH desempeña un papel principal en los protocolos de estimulación ovárica. El tratamiento con FSH al inicio de la estimulación ovárica es esencial para que se adquiera sensibilidad hacia la LH de modo que ésta sea capaz de sostener el desarrollo folicular desde la mitad hasta el final de la fase folicular.

En el caso de la LH es posible sugerir la incorporación de la hormona a todos los protocolos de estimulación debido a las dificultades para saber qué clase de pacientes pueden beneficiarse de este suplemento hormonal y a que no hay evidencias claras de que influya negativamente sobre los resultados de la estimulación. Probablemente, la acción de la LH sobre el desarrollo folicular no se limita a aportar andrógenos como sustrato del proceso de aromatización, sino que puede ejercer un efecto directo sobre la estimulación y la modulación de la folículoogénesis. Las concentraciones elevadas de LH en la fase folicular son perjudiciales para el desarrollo folicular, desembocando en la recuperación de ovocitos post-maduros y en un empeoramiento de los resultados reproductivos, sugiriendo que estos altos niveles hormonales afectan a los resultados de los ciclos de estimulación ovárica.

Por lo tanto, la prescripción de LH sólo será estrictamente necesaria en casos de hipogonadismo hipogonadotrópico, mientras que la hipotética función beneficiosa de la hormona en los tratamientos de reproducción como factor coadyuvante del crecimiento folicular es objeto de un intenso debate (Levi-Setti et al. 2004). Aunque la controversia no ha desaparecido, cada vez hay más señales positivas que indican la posible relevancia de la LH en la inducción de la ovulación: se acorta la duración del tratamiento, se consumen menos gonadotropinas y se reduce el desarrollo de folículos de pequeño tamaño. De acuerdo con Shoham (Shoham 2002) se define un valor mínimo o “umbral” por debajo del cual la síntesis de estradiol es deficiente y un valor máximo o “techo”, por encima del cual la LH resulta perjudicial para el crecimiento y desarrollo folicular.

La necesidad de un aporte adicional de LH es más notable en mujeres que responden mal a un protocolo largo con agonistas de la GnRH usando exclusivamente

FSH y en pacientes que requieren cantidades excesivas de FSH para el desarrollo multifolicular (Messinis et al. 2010).

2.1.3 Agentes desencadenantes de la ovulación.

En el ciclo natural, la ruptura del folículo dominante y la liberación posterior del ovocito se desencadenan como respuesta al pico de LH que surge a mitad de ciclo. En los ciclos estimulados este refuerzo repentino de la síntesis y liberación de LH (y también de FSH) se debe a los altos niveles de E₂ característicos de la fase folicular tardía en combinación con concentraciones de progesterona (P4) ligeramente elevadas, que inducen picos impredecibles pero precoces de LH.

Como se ha mencionado previamente, los análogos de la GnRH impiden que esto ocurra y en consecuencia, se usa hCG exógena en la fase folicular tardía para sustituir al pico endógeno de LH. Este procedimiento se ha convertido en la técnica de referencia para inducir la maduración del ovocito y la formación del cuerpo lúteo en los programas de fecundación *in vitro*. La hCG exógena también está implicada en el mantenimiento de una función luteotrópica como consecuencia de su prolongada vida media, aunque desafortunadamente parece contribuir a los cambios que desembocan en la aparición del síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO).

Los primeros estudios posteriores a la estimulación ovárica para FIV mostraron que se podía inducir de manera fiable el pico endógeno de LH mediante la administración de GnRH natural o de agonistas de la hormona. Así se reproducían picos de LH (y FSH) más fisiológicos que los que se obtenían con la administración de hCG exógena, debido a que los agonistas tienen una vida media más corta (Zelinski-Wooten et al. 2000) y a que las concentraciones de esteroides de la fase lútea se acercan más a los rangos fisiológicos (Fauser et al. 2002). Estos métodos de inducción de la maduración ovocitaria mediante agonistas de la GnRH perdieron interés durante los años 90, ya que los protocolos de estimulación ovárica incluían a a-GnRH para impedir el pico prematuro de LH durante la fase folicular, dejando a la hipófisis desensibilizada y excluyendo la posible aparición del pico endógeno de LH.

Con la publicación de los primeros estudios con antagonistas de la GnRH, los temas relacionados con los mecanismos responsables de desencadenar la ovulación

vuelven a adquirir interés, ya que el bloqueo de las células gonadotrópicas de la hipófisis por los antagonistas puede revertirse inmediatamente con la administración de agonistas, permitiendo la reevaluación de las posibilidades de estimular la aparición de un pico endógeno de LH a mitad de ciclo (Ditkoff et al. 1991); el agonista desplaza al antagonista del receptor de GnRH induciendo una activación inicial del receptor previa a la desensibilización del mismo. Sin embargo, hay diferencias en cuanto a las características del pico de LH en función de si viene provocado por el agonista o si estamos considerando el ciclo natural: si el pico de LH viene inducido por el agonista se liberan menos gonadotropinas hipofisarias lo que se traduce en la aparición de una fase lútea defectuosa (Humaidan et al. 2009).

Como los agonistas de la GnRH poseen ciertas ventajas sobre la hCG en la reducción de riesgos del SHO, la pregunta es: ¿cómo se pueden mejorar las condiciones de la fase lútea? Los primeros estudios revelaron resultados reproductivos muy malos cuando se usaban agonistas de la GnRH para inducir la ovulación, con tasas de aborto extremadamente altas a pesar del suplemento de fase lútea con progesterona vaginal y estradiol oral, atribuyéndose estos malos resultados al efecto de los agonistas sobre cuerpo lúteo y endometrio (Kolibianakis et al. 2005).

2.2 Protocolos de preparación endometrial en la receptora.

El objetivo del tratamiento sustitutivo en la receptora de ovocitos es preparar el endometrio para recibir al embrión, permitir la implantación y mantener los estadios iniciales de la gestación hasta que la placenta asume su propia autonomía, alrededor de los 50-60 días de gestación.

Es necesario administrar estrógenos exógenos para conseguir la proliferación endometrial y gestágenos para inducir la transformación secretora del endometrio. El estradiol en la fase folicular es responsable de la proliferación del epitelio superficial, glándulas, estroma y vasos sanguíneos de la capa funcional del endometrio e induce la síntesis de proteínas específicas, incluyendo los receptores de estrógenos y progesterona. En cuanto al papel que desempeña en la fase lútea, está menos definido aunque parece necesario para el desarrollo del endometrio progestacional. La suspensión de la administración de estrógenos en la fase lútea interfiere en el proceso de invasión de la

decidua por el trofoblasto, y sobre todo, en el mantenimiento de las etapas iniciales del embarazo, conduciendo a abortos muy precoces (Younis et al. 1996).

En cuanto a la duración del tratamiento, la necesidad de la flexibilidad del tratamiento con estradiol para coordinar la preparación de donantes y receptoras lleva a los clínicos a cuestionarse la posible influencia de la duración de la terapia estrogénica sobre los resultados de los ciclos de donación de ovocitos. Este hecho era particularmente importante cuando se alargaba la lista de espera de las receptoras, por lo que una estrategia válida era iniciar la preparación independiente de la donante y de la receptora antes de que fueran asignadas la una a la otra de modo que cuando se programaba la punción de la donante, los ovocitos se adjudicaban a la pareja que, aparte del grupo sanguíneo y otras características fenotípicas, llevaba más tiempo con el protocolo de preparación endometrial (Soares et al. 2008).

Sin embargo, con la aparición de las técnicas de criopreservación ovocitaria, se resuelven problemas derivados de las receptoras como un sangrado precoz por disrupción endometrial, y se ofrece la posibilidad de congelar ovocitos de donantes con características especiales; gracias a esta alternativa es posible transferir en ciclo natural de la receptora y/o disminuir los tiempos de lista de espera ya que los ovocitos pueden donarse tan pronto como se haya completado la preparación endometrial de la receptora.

2.3 Sincronización del ciclo donante-receptora.

La sincronización de los ciclos menstruales tanto de la donante como de la receptora es una premisa fundamental para el éxito del programa de donación ovocitaria. Las donantes pueden estar en tratamiento con anticonceptivos orales antes de sincronizar el inicio del ciclo con el de la receptora; posteriormente se les administran análogos de la GnRH (agonistas/antagonistas) para prevenir el pico prematuro de LH y gonadotropinas para el desarrollo multifolicular. En el caso de las receptoras, también se prescribe un análogo de la GnRH (agonista/antagonista) para frenar la hipófisis siempre que haya actividad en el ovario y se indica estradiol con el inicio de la menstruación (dosis diaria durante 12-14 días) seguido de progesterona vaginal una vez que se haya producido la donación y se haya confirmado la fecundación; como las dosis de estradiol son relativamente fisiológicas y no contraceptivas, pueden surgir picos ocasionales de LH con

una exposición prematura a la progesterona que en última instancia supone la cancelación de un 10-20% de los ciclos (Klein and Sauer 2002).

Normalmente se recomiendan dos semanas de tratamiento con estradiol en las receptoras antes de incorporar la progesterona aunque para donaciones comprometidas o casos en los que se ha documentado cierto riesgo de la receptora para una disrupción endometrial precoz es posible completar la preparación endometrial en 7 días, que es el mínimo intervalo de tiempo para que el endometrio exprese receptores de progesterona; el inicio de tratamiento con estrógenos se fija unos pocos días antes de que la donante comience con las gonadotropinas ya que el período de estimulación de la donante suele ser más corto que la fase folicular de un ciclo menstrual normal. El régimen más común utiliza estradiol oral, bien a dosis constantes (4-8 mg/día) bien a dosis que se incrementan gradualmente. Una vía de administración alternativa es mediante parches transdérmicos. En caso de un período prolongado de estimulación o de cualquier tipo de retraso no previsto es importante garantizar la existencia de cierto grado de flexibilidad en la terapia con estrógenos, ya que se han observado tasas de gestación aceptables en pacientes en los que el tratamiento se ha prolongado durante dos meses (Bosch et al. 2001).

El caso de la progesterona es más crítico, ya que se han publicado numerosos estudios sobre cuándo introducir el tratamiento con progesterona y a qué dosis. La cancelación de un ciclo de donación por mala calidad ovocitaria o por fallo de fecundación es un hecho frustrante en los tratamientos de reproducción asistida. Un segundo intento dentro del mismo ciclo es posible si la receptora continúa con la terapia estrogénica hasta que se encuentre una nueva donante compatible; sin embargo, una vez que se ha iniciado la administración de progesterona, el intervalo de tiempo en que se puede llevar a cabo la transferencia embrionaria es limitado, de modo que la cancelación del ciclo es inevitable ya que se ha perdido la sincronización entre el endometrio y el desarrollo del embrión. Esta carrera contra el tiempo puede evitarse si previamente se confirma la calidad ovocitaria y la fecundación, retrasándose el inicio de la progesterona hasta este momento. Teniendo en cuenta estas premisas iniciales, el suplemento de progesterona comenzaría el día después de la donación (día +1), mientras que la transferencia se realizaría sólo dos días después de haberse iniciado el tratamiento en el caso de que la transferencia se realice en día 3 de desarrollo embrionario. Este protocolo

se ha confirmado como de gran utilidad en los programas de donación. El impacto psicológico de la cancelación de un ciclo en la receptora es considerable ya que hay que reiniciar la preparación endometrial y prolongar el tiempo de espera. El principal objetivo de estos tratamientos debe ser garantizar la transferencia embrionaria y la mejor forma de conseguirlo es iniciando la administración de progesterona una vez que se ha confirmado la fecundación (Escribá et al. 2006).

El tratamiento con estrógenos y progesterona se mantiene a lo largo de toda la fase lútea y en caso de embarazo, es recomendable mantenerlo hasta el final del primer trimestre de gestación.

2.4. Resultados de los programas de donación de ovocitos

La experiencia clínica y el conocimiento de las complicaciones relacionadas con la edad y con las gestaciones múltiples suponen la introducción de una serie de cambios en la gestión y el tratamiento de un programa de donación de ovocitos. Como se ha comentado previamente, los programas de donación de ovocitos presentan los mejores resultados dentro de los distintos tratamientos de reproducción asistida. Es importante destacar la disminución en el número medio de embriones transferidos (de 3.6 embriones a 1.9 embriones) sin que eso haya afectado a las tasas globales de gestación y esta evidente mejoría en las tasas de gestación, implantación y gestación clínica se asocian a un descenso importante en la proporción de gestaciones múltiples y de la tasa de aborto (Budak et al. 2007).

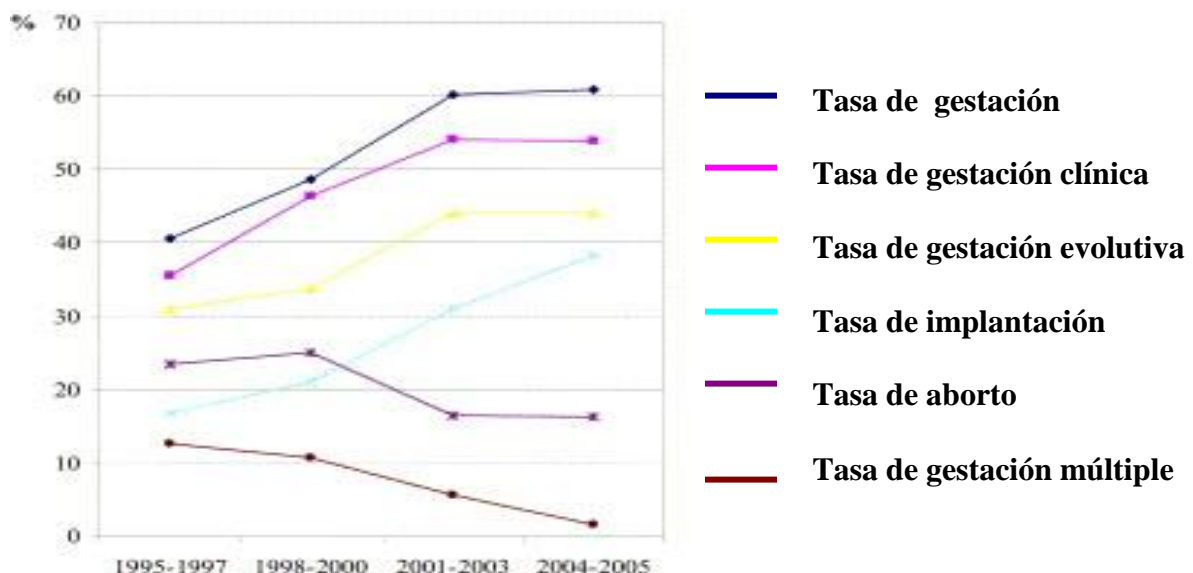


Figura 3. Evolución de los resultados del programa de donación de ovocitos en el IVI

(Budak et al. 2007).

La mayoría de trabajos publicados no describen disminuciones notables en los resultados gestacionales en función de la edad de la receptora. En 2005, el Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) publica el estudio más amplio con datos obtenidos de un mismo centro que relaciona la edad de la receptora y resultados de los ciclos de donación (Soares et al. 2005), demostrándose que las tasas de gestación, implantación y aborto empeoran progresivamente a partir de los 45 años. Sin embargo, este tema sigue generando opiniones controvertidas en cuanto a la posibilidad de establecer un límite de edad por encima del cual deba rechazarse la realización de un tratamiento de fertilidad, ya que se han descrito numerosos ejemplos de los riesgos que conlleva un embarazo en mujeres de edad avanzada como son los casos de muerte fetal, bajo peso, hipertensión, diabetes (Salihu et al. 2003)... Nuestro programa de donación de ovocitos orienta a las mujeres con una edad superior a 45 años hacia la transferencia de un único embrión con el propósito de reducir al mínimo la aparición de complicaciones obstétricas.

Actualmente se considera la idea de que, aunque cada caso debe valorarse de forma individual, en principio debe desaconsejarse la donación de ovocitos en receptoras que sobrepasen los 50 años. Estas consideraciones coinciden con los fundamentos de la Ley de Reproducción Asistida que fija la edad límite de las usuarias de estas técnicas de reproducción en la ausencia de riesgos para ella misma durante el tratamiento y embarazo y para la descendencia que se puedan derivar de una maternidad a una edad clínicamente inadecuada.

3. Limitaciones de las técnicas de reproducción asistida. Necesidad de mejoras.

Un paso clave en los tratamientos de Reproducción Asistida, es la evaluación del ovocito y de la calidad embrionaria para determinar los embriones con mayores probabilidades de derivar en una gestación.

Las tasas de gestación obtenidas en los ciclos de fecundación *in vitro* han progresado paralelamente a los avances técnicos y tecnológicos, aunque se ha mantenido como práctica habitual la transferencia de más de un embrión, hecho que se traduce en

una amplia proporción de gestaciones múltiples con los riesgos que conlleva en concepto de partos prematuros y complicaciones obstétricas y pediátricas.

Como consecuencia de los riesgos asociados a este tipo de gestaciones, uno de los mayores desafíos a los que se enfrentan los clínicos es lograr el mayor número posible de embarazos únicos. Sin embargo, las reticencias que acompañan a las políticas de transferencia de un solo embrión ponen de manifiesto la necesidad de identificar nuevos factores asociados a un aumento de la competencia embrionaria.

Como se ha comentado previamente, el desarrollo de las técnicas de fecundación *in vitro* ha sido considerado como la solución definitiva para las parejas infértiles. La capacidad de obtener muchos ovocitos, y en consecuencia un mayor número de embriones potencialmente transferibles en cada ciclo de estimulación conduce a la siguiente problemática: las gestaciones múltiples y el hecho de que las tasas de éxito son todavía bajas en relación al número de embriones generados. De hecho, en un análisis reciente (Patrizio and Sakkas 2009) se indica que la tasa de recién nacido vivo es inferior al 7% en relación a los ovocitos recuperados, y que estos resultados se mantienen incluso en los ciclos de donación de ovocitos, el grupo con mejor calidad ovocitaria, donde este dato es sólo del 6.8%.

Siguiendo esta misma línea argumental, cuyo punto de partida es la evidencia de que no todos los ciclos finalizan con un recién nacido vivo en el primer intento y que no todos los ciclos tienen éxito independientemente del número de intentos, nuestro centro (Garrido et al. 2011) llevó a cabo un estudio en el que se calcula la tasa acumulada de recién nacido vivo en función del número de embriones transferidos (en sucesivos ciclos) para alcanzar el objetivo propuesto.

Como se observa en la figura, la probabilidad de que una pareja logre llevarse un niño a casa aumenta conforme lo hace la cantidad de embriones transferidos en ciclos consecutivos de estimulación, es decir, cada embrión tiene más probabilidad acumulada que el anterior de finalizar el ciclo con éxito. Sin embargo, de la gráfica también se deduce el hecho de que independientemente del número de embriones transferidos, existe un porcentaje de ciclos que nunca logran el objetivo deseado.

Ante esta aparente incapacidad para estimar con garantías el potencial reproductivo de un embrión dentro de una cohorte mediante los criterios actuales de

selección embrionaria, el escenario que se perfila para los profesionales relacionados con la Medicina Reproductiva está estrechamente relacionado con la transferencia de un único embrión, por lo que nos veremos forzados a realizar ciertos cambios en las estrategias de tratamiento, como la aplicación de protocolos de estimulación menos agresivos aunque paradójicamente este hecho conduce a una mayor proporción de embriones viables (Inge et al. 2005) y al perfeccionamiento de los criterios de selección que definen la calidad embrionaria, de modo que el embrión transferido sea el que cuenta con mayores posibilidades de implantación.

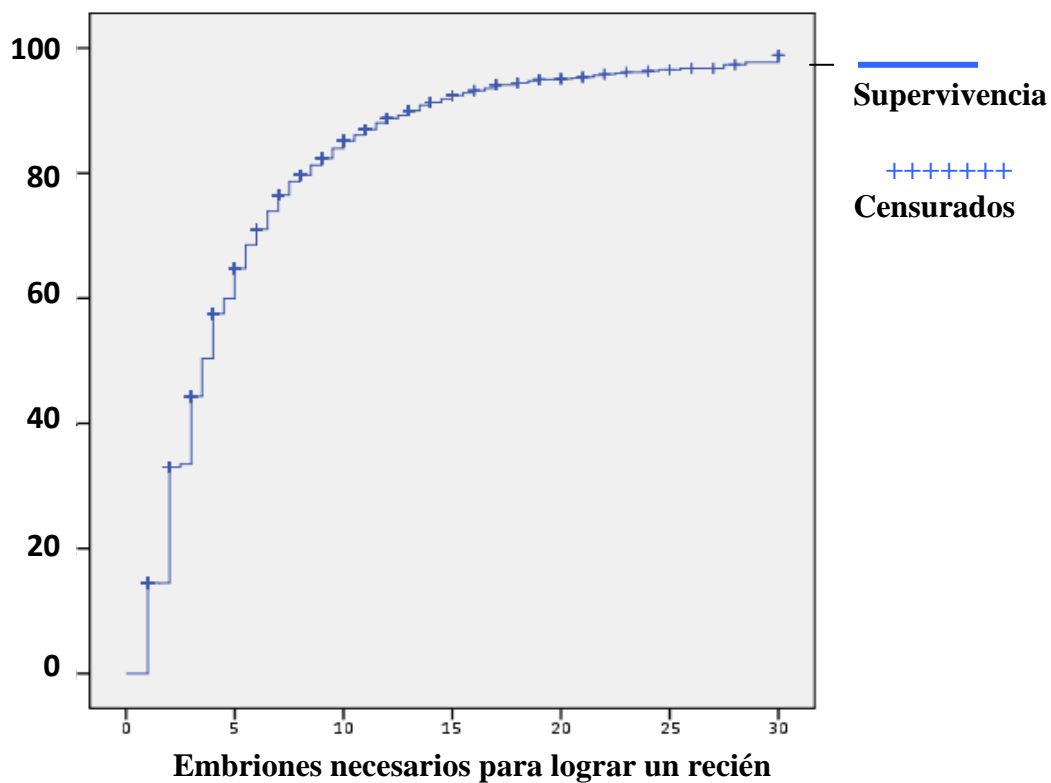


Figura 4. Tasa acumulada de recién nacido vivo en ciclos de donación de ovocitos
(Garrido et al. 2011).

4. Influencia de la estimulación ovárica en el desarrollo embrionario.

En los últimos años la tendencia dominante sugiere que para obtener más ovocitos hay que estimular al ovario de forma más agresiva; sin embargo, y como contraposición, se publican una serie de estudios en los que se plantea el hecho de que cantidad no equivale a calidad (Pellicer et al. 1989b, van der Gaast et al. 2006).

Los primeros trabajos relacionados con el efecto deletéreo de las gonadotropinas exógenas sobre el desarrollo embrionario se llevan a cabo en roedores, en los que se describe que la estimulación ovárica afecta y retrasa el desarrollo embrionario hacia blastocisto en embriones de ratón de 2-células (Van der Auwera and D'Hooghe 2001). Sin embargo, los resultados obtenidos en embriones humanos no coinciden con las conclusiones extraídas de los estudios con modelos animales. Los trabajos desarrollados por Ziebe (Ziebe et al. 2004) no muestran diferencias significativas en las tasas de división, en la capacidad de desarrollo a blastocisto ni en el grado de fragmentación en la calidad embrionaria entre ciclos estimulados con agonistas de la GnRH y ciclos naturales.

La descripción de receptores extrahipofisarios de la GnRH en tejidos como el endometrio, el útero, los complejos cúmulo-ovocito, embriones pre-implantatorios y placenta conduce a la hipótesis sobre los posibles efectos nocivos de los antagonistas de la GnRH sobre el desarrollo embrionario. Estas dudas no se ven confirmadas al demostrarse que el desarrollo potencial de embriones pre-implantatorios humanos no parece estar limitado por los antagonistas, que altas dosis de este análogo de la GnRH no afectan el potencial de implantación embrionario al no dañar la receptividad endometrial y que no existen diferencias en las tasas de nacidos vivos entre protocolos de estimulación con agonistas y antagonistas (Santos et al. 2010).

En cuanto a los problemas que puede representar la supresión de las concentraciones de LH al final de la fase folicular para los resultados de un ciclo de fecundación *in vitro*, se plantea la introducción de LH exógena en los protocolos de estimulación ya que suplementar la actividad de esta hormona puede resultar ventajoso a la hora de obtener mayor cantidad de embriones fecundados correctamente (Weghofer et al. 2008) y de embriones pre-implantatorios de alta calidad. Por otro lado, un aumento considerable de los niveles de LH en la fase folicular se asocia a un descenso de la fertilidad y a un aumento en las tasas de aborto, dato que se confirma al demostrarse que el tratamiento con LH recombinante afecta al desarrollo del folículo preovulatorio.

Aunque se identifica a la edad materna como el principal factor de riesgo en la aparición de aneuploidías cromosómicas, se han publicado una serie de trabajos en los que se describen aumentos notables de anomalías cromosómicas y mosaicismo en embriones tempranos procedentes de ciclos estimulados (Rubio et al. 2010). Se piensa

que la mayor presencia de embriones aneuploides se debe a la interferencia de la estimulación ovárica en la selección natural de los ovocitos de buena calidad y/o a la exposición de los folículos en desarrollo a los efectos perjudiciales de la hiperestimulación ovárica sobre la maduración ovocitaria.

5. Marcadores de calidad embrionaria.

5.1 Marcadores clásicos. La generación de criterios para la selección de “embriones competentes” en el momento de la transferencia se ha convertido en un tema de máxima importancia. Históricamente, las aproximaciones para identificar a los mejores embriones antes de la transferencia se centraron fundamentalmente en la valoración morfológica de los mismos; evidentemente, estos criterios proporcionaban indicios que reforzaban la capacidad del embriólogo durante la selección embrionaria en el momento de la transferencia.

La capacidad (o la ausencia de ella) de estimar correctamente la competencia de un embrión se ha convertido en un punto crítico del desarrollo embrionario, ya que actualmente, las parejas sometidas a un tratamiento de Reproducción Asistida presentan una mayor proporción de embriones disponibles para ser transferidos y/o congelados. Este hecho tiene su origen en las mejoras introducidas tanto en los protocolos médicos de estimulación ovárica como en la posibilidad de garantizar la fecundación mediante la aplicación de un ICSI. Los métodos actuales incluyen la observación de los gametos y embriones en distintas etapas del desarrollo, comenzando con los ovocitos, seguido de los cigotos en pronúcleos, y las sucesivas divisiones embrionarias hasta que se alcanza el estadio de blastocisto. Adicionalmente, se han estudiado otros marcadores como la morfología ovocitaria (Balaban and Urman 2006), el “score” pronuclear (Scott et al. 2000) y la división temprana (Sakkas et al. 2001). Todos estos parámetros complementan individualmente o en conjunto la evaluación “original” del embrión, aunque su utilidad y aplicación práctica sean objeto de un intenso debate.

Los criterios morfológicos y de crecimiento actuales que se usan para evaluar la competencia embrionaria en día 3 bien subestiman bien sobreestiman el potencial de desarrollo embrionario. Dada la situación de incertidumbre asociada al examen

morfológico en día 3, algunos centros de reproducción han optado por el cultivo prolongado para evaluar la calidad embrionaria; sin embargo, la transferencia de blastocistos, a pesar de mejorar las tasas de implantación y ser el resultado de una selección natural en la cohorte embrionaria, implica extender la duración del cultivo *in vitro* lo que eleva las posibilidades de alteración de la expresión génica y de la herencia epigenética (Manipalviratn et al. 2009).

Junto con los obstáculos técnicos derivados de la mínima cantidad de material embrionario, la pregunta de qué constituye un embrión normal complica la interpretación de los resultados. En cualquier campo de investigación, la definición precisa del fenotipo más viable es un requisito esencial cuyo propósito es contribuir a resolver el tema en cuestión; sin embargo, en el contexto sobre como mejorar los resultados de los tratamientos de Reproducción Asistida y aumentar el rendimiento en la producción de embriones transferibles, el fenotipo “perfecto” aún está por describir. La definición de calidad embrionaria es un concepto vago e impreciso, porque ¿qué es exactamente un “buen embrión”? ¿Sobre qué criterios estudiamos y comparamos a los embriones con el objetivo de conocer sus características subyacentes? Esta cuestión es primordial y resulta complicado comprender de acuerdo a nuestros conocimientos actuales sobre desarrollo embrionario (Seli et al. 2010). El hecho de que las interpretaciones morfológicas sean susceptibles de mejora se basa en la búsqueda continuada de nuevos marcadores de selección embrionaria.

Mientras que el examen morfológico tiene la ventaja de ser un método sencillo, no invasivo y rápido, presenta la desventaja de ser poco fiable, altamente subjetivo, que precisa de formación especializada y cierto grado de experiencia y con pocas esperanzas de estandarización. Incluso en el mejor escenario posible, donde la calidad embrionaria se determina retrospectivamente en función de las tasas de gestación, los embriólogos únicamente pueden inferir la calidad de los embriones que han gestado; en casos donde no se consigue un embarazo, los embriones pueden ser de muy buena calidad y el fallo de implantación deberse a variables independientes como un factor uterino o una mala técnica de transferencia.

Resulta inquietante advertir que esta definición tan imprecisa de los fenotipos deseados impacta directamente sobre la interpretación de los resultados, ya que

actualmente no podemos apreciar su valor sin ser capaces de situarlos dentro de un contexto fisiológico y además, no podemos esperar que los embriones obtenidos en un medio artificial presenten las mismas características que los embriones que han crecido *in vivo*.

5.2 Nuevos marcadores de calidad embrionaria. La información biológica incluye la información contenida en el genoma y las cuestiones ambientales externas a este material genético. La integración de ambas conduce a la ejecución dinámica de las instrucciones asociadas con el desarrollo embrionario y a las respuestas fisiológicas al medio en el que se encuentran. En los últimos tiempos, el desarrollo de la tecnología adecuada ha permitido el acceso a la información contenida en el genoma, haciendo de la biología una ciencia única en el sentido de que los investigadores cuentan con un núcleo central de información, accesible y que actúa como punto de partida para la comprensión de los distintos procesos del desarrollo embrionario.

Como se ha comentado en el punto anterior, los criterios embrionarios de evaluación morfológica se caracterizan por presentar un bajo valor predictivo, de ahí la importancia de establecer alternativas más objetivas y fiables que faciliten la valoración de la calidad embrionaria. En la búsqueda de nuevos marcadores de uso clínico que intentan traducir las determinaciones cualitativas en datos cuantitativos, destacan las “-ómicas” como tecnologías emergentes que se pueden aplicar al estudio de una amplia variedad de moléculas biológicas. Estos nuevos procedimientos permiten identificar y cuantificar todos los componentes de los sistemas celulares desde un punto de vista espacio-temporal, diseccionando las vías intracelulares y obteniendo una cantidad enorme de información en un corto espacio de tiempo, a la vez que ofrecen la oportunidad de investigar las relaciones entre el genotipo de un organismo y el fenotipo resultante (Hamamah 2011). La posibilidad de acceder a estos conocimientos supone una nueva forma de pensamiento global en lo que a cuestiones biológicas se refiere, aunque la interpretación y gestión de esta información precise el desarrollo de herramientas estadísticas y bioinformáticas de probada eficacia y potencia.

Recientemente, han comenzado a aplicarse las “-ómicas” al área de la Reproducción Asistida. Aunque el número de posibilidades está en continuo crecimiento,

las tres alternativas más desarrolladas y usadas en reproducción incluyen a la transcriptómica, proteómica y metabolómica que van a contribuir al diseño de nuevas metodologías con el objetivo de promover las transferencias de un único embrión, evaluar el impacto de los protocolos de estimulación sobre la receptividad endometrial e identificar proteínas que determinen el desarrollo normal y/o degenerativo del embrión. De las metodologías propuestas, la transcriptómica y la proteómica son técnicas invasivas que todavía deben demostrar unos beneficios clínicos considerables para justificar su aplicación.

De las tecnologías disponibles, el análisis del RNA mensajero parece ser la más prometedora en cuanto a aplicación clínica al combinar la extrema sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el análisis del transcriptoma completo mediante el estudio del DNA complementario (cDNA). Distintos estudios sugieren que la expresión de una serie de genes concretos puede actuar como marcadores de la viabilidad embrionaria. Sin embargo, la hipótesis tradicional basada en la identificación de moléculas individuales es una forma relativamente pobre de obtener marcadores de viabilidad de uso clínico ya que se trata de una técnica lenta, laboriosa y con riesgo de seleccionar embriones sesgados con un aspecto particular de la viabilidad (Brison et al. 2007).

El análisis de la composición proteica (proteoma) del embrión supone un desafío diferente debido a la baja concentración y al amplio rango de moléculas que necesitan ser analizadas y porque, al contrario que el RNA mensajero, no es posible amplificar las proteínas para su análisis de modo que su aplicación clínica en comparación con la transcriptómica y la metabolómica está bastante limitada (Hamamah et al. 2006). Sin embargo, ninguna de estas dos técnicas ha presentado unos resultados clínicos que justifiquen su incorporación a la práctica diaria de un laboratorio de Embriología; además, cualquier técnica analítica debe ser no invasiva con el objetivo de minimizar los riesgos relacionados con el embrión y sencilla para reducir al mínimo las complicaciones que puedan derivarse de su aplicación.

Dentro de las nuevas tecnologías no invasivas de evaluación embrionaria destaca la metabolómica, la cual pretende identificar y cuantificar la composición global de los metabolitos presentes en el medio de cultivo embrionario (Goodacre et al. 2004), ya que

hay estudios que indican que los embriones que derivan en una gestación y los que no, son diferentes desde un punto de vista metabólico (Botros et al. 2008, Nagy et al. 2008). Los tests metabolómicos de los medios de cultivo pueden optimizar los procesos de selección embrionaria y en consecuencia las posibilidades de embarazo, mejorando la eficacia de los tratamientos de FIV; pueden identificar correctamente los embriones con mayor potencial de implantación reduciendo la proporción de gestaciones múltiples, son capaces de estimar la calidad global de la cohorte embrionaria y pueden resultar útiles en la selección de los gametos con mejores perspectivas evolutivas.

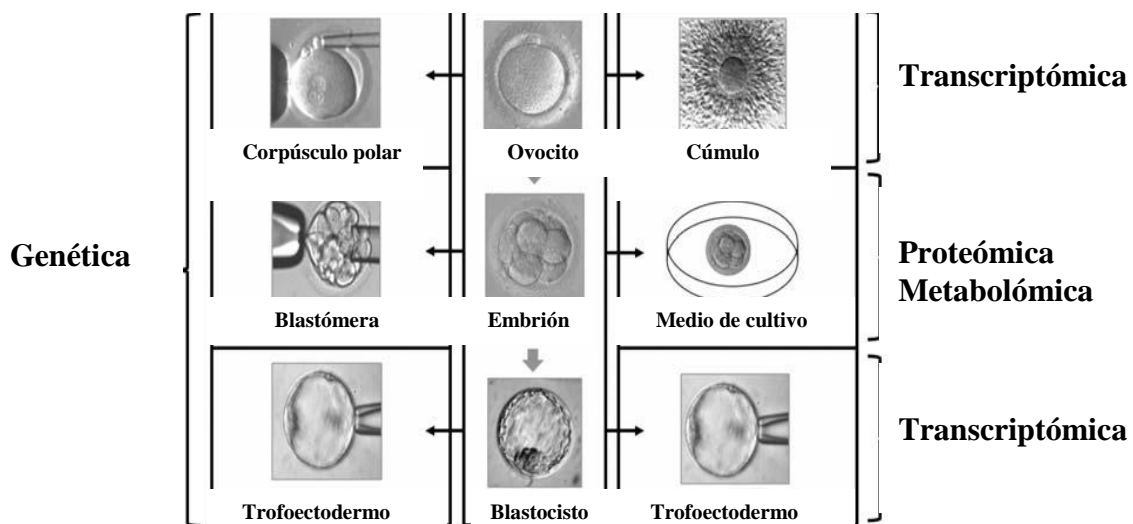


Figura 5. Nuevas técnicas de selección embrionaria (Assou et al. 2011)

La aplicación de estas tecnologías a los programas de Reproducción Asistida persiguen mejorar los procesos de selección embrionaria optimizando las oportunidades de gestación, reducir y/o eliminar los riesgos de gestación múltiple, estimar globalmente la competencia de la cohorte embrionaria, economizar las opciones de tratamiento, evaluar la salud embrionaria y el impacto de los protocolos de estimulación ovárica.

Cualquiera de las alternativas desarrolladas hasta ahora puede emerger en un futuro como una herramienta adicional a los criterios morfológicos convencionales de selección embrionaria. Las características que deben definir a estas innovaciones tecnológicas son un carácter no invasivo, fáciles de usar sin conocimientos específicos ni ningún tipo de entrenamiento, económicas, rápidas, fiables y reproducibles, que encajen

en el trabajo diario del laboratorio sin forzar cambios en la rutina y que aporten información adicional a los criterios morfológicos clásicos. Sin embargo, muchas de estas técnicas todavía se encuentran en fase de investigación básica por lo que los resultados clínicos son escasos, se precisa de personal altamente cualificado, las clínicas/laboratorios de reproducción no suelen contar con el equipamiento necesario por lo que en muchas ocasiones es obligatorio trasladar las muestras a centros especializados y se trata de ensayos de difícil aplicación clínica por su complejidad y su carácter invasivo ya que la mayoría precisan de cierto grado de manipulación embrionaria

6. Análisis de imagen. Aplicaciones en Embriología.

El estudio de la dinámica intracelular se ha considerado un paso fundamental en la comprensión de la naturaleza celular de modo que en los últimos 25 años, la biología celular se ha beneficiado de los logros alcanzados en la tecnología de análisis de imagen. Durante la década de los 80, el uso del video analógico expandió enormemente el uso del microscopio óptico como herramienta analítica (Inoue 1986) y en los últimos años, los sistemas analógicos han sido reemplazados por los sistemas digitales (Sluder and Wolf 2003).

Como se ha comentado previamente, la mayoría de sistemas vigentes que se utilizan para evaluar la calidad embrionaria en ciclos de FIV son muy subjetivos y se basan en inspecciones visuales de la morfología en un instante concreto del desarrollo. Los sistemas de clasificación basados únicamente en criterios cualitativos pueden ser una de las principales causas de las variaciones “inter/intra-observadores” descritas por Bendus (Baxter Bendus et al. 2006), donde términos como “cerca”, “bien” y “mucho” son muy imprecisos. En estas circunstancias es inevitable que esta variabilidad afecte a la decisión sobre qué embrión(es) es seleccionado(s) para la transferencia, y por lo tanto, tiene un impacto directo sobre las probabilidades de éxito del ciclo.

Las técnicas de análisis de imagen añaden objetividad a los procesos de valoración embrionaria y en consecuencia, permiten mejorar los criterios de selección y los resultados de los tratamientos de Reproducción Asistida. Sin embargo, el reconocimiento automático de los rasgos embrionarios puede resultar problemático según la calidad de la imagen, las diferencias morfológicas en función de la etapa de desarrollo

considerada, el volumen de los datos analizados, posición y transparencia del embrión. Pero gracias al desarrollo de la bioinformática los esfuerzos se han centrado en la puesta a punto de programas que permitan el análisis automático de la imagen obtenida al microscopio permitiendo una valoración cuantitativa de los aspectos clave de la morfología embrionaria y el almacenamiento de los datos relacionados con estas determinaciones, las cuales pueden usarse para mejorar nuestro conocimiento acerca del desarrollo embrionario temprano y conducir hacia sistemas de clasificación morfológica mucho más sofisticados.

En contraste con las valoraciones diarias del desarrollo embrionario aplicadas rutinariamente en los ciclos de reproducción asistida, los sistemas de análisis de imagen ofrecen una serie de beneficios entre los que se incluyen las determinaciones exactas de las divisiones celulares y sucesos morfológicos como el momento de la compactación y/o la aparición de la cavidad blastocélica, además de la formación y reabsorción de fragmentos. También, evita interpretaciones incorrectas de ciertos fenómenos como por ejemplo confundir un fragmento de gran tamaño con una célula en un momento determinado y permite un seguimiento más estrecho de procesos como la fragmentación y el colapso del blastocisto (Pribenszky et al. 2010) obteniéndose una visión mucho más auténtica del desarrollo embrionario, incluido el posible descubrimiento de nuevas correlaciones. El *time-lapse* (término anglosajón que implica la captura de una secuencia de imágenes para su análisis posterior) otorga a los embriólogos un sistema de toma de decisiones mucho más potente que se basa en el estado real del embrión y en el proceso de desarrollo embrionario.

La posibilidad de establecer observaciones mediante time-lapse existe desde hace décadas (Cole 1967); sin embargo, las complicaciones técnicas, financieras y conceptuales han obstaculizado su aplicación. El interés se centra en dos posibles soluciones: a partir de un microscopio disponible comercialmente construir un incubador alrededor del mismo (Hardarson et al. 2002); Stage-top Incubator, Tokai-hit, Japón); o trabajar con un incubador común al que se le integra un microscopio y una serie de estructuras mecanizadas que permitan el movimiento de las placas de cultivo (Arav et al. 2008); Embryoscope, Unisense Fertilitech, Dinamarca; Incu-Cell Live, Sanyo, Japón; Bio-Station, Nikon, Japón). No obstante, el análisis automático de la imagen embrionaria

incluye varios desafíos para la comunidad científica. En primer lugar, la mayoría de las características morfológicas analizadas no se perciben bien de forma inmediata, por lo que se suele necesitar algún ajuste relacionado con el enfoque del microscopio. No hay que olvidar que el embrión es tridimensional por lo que algunas estructuras que son claramente visibles en un plano, desaparecen si cambiamos el enfoque por lo que un análisis fiable debe incluir la posibilidad de tomar imágenes del embrión desde diferentes planos.

A pesar de los trabajos publicados en los que se describen ciertos avances en el uso de la tecnología de análisis de imagen a nivel embrionario (Hnida et al. 2004), la cantidad global de material disponible es escasa, aunque cada vez hay más datos que apoyan el concepto de que un “score” morfológico acumulativo, derivado de múltiples evaluaciones independientes, constituye la mejor guía para valorar el potencial embrionario (Neuber et al. 2006). La nueva generación de sistemas que combinan incubador y microscopio, ofrece la posibilidad de describir las características morfológicas sin necesidad de sacar a los embriones de las condiciones óptimas de gas y temperatura que se encuentran dentro del incubador; este hecho reduce el estrés ambiental experimentado por el embrión que se traduce en una competencia embrionaria y en unas tasas de gestación similares a las obtenidas en los sistemas clásicos de cultivo.

El uso de la tecnología de análisis de imagen supone para el embriólogo el ahorro de una gran cantidad de tiempo y la disponibilidad de 24 horas de observación continua, mejora la eficacia de los ciclos de FIV reduciendo los costes y aumentando la capacidad de los clínicos para la identificación del embrión con mejores perspectivas de viabilidad. Los avances en este campo científico pueden llegar a ser de vital importancia a la hora de implantar una política de transferencia de un único embrión y la consiguiente disminución en la proporción de gestaciones múltiples (Filho et al. 2010)

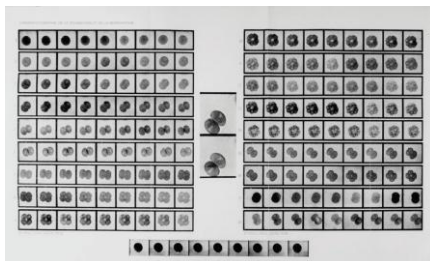


Figura 6. Evolución de la tecnología de análisis de imagen.**7. Time-lapse y cinética del desarrollo embrionario.**

La presión creciente para disminuir el número de embriones que se transfieren al útero conduce al desarrollo de nuevas estrategias cuyo objetivo es optimizar el poder predictivo de la calidad embrionaria. Cummings (Cummins et al. 1986) es el primero en confirmar la eficacia de combinar una clasificación subjetiva de la morfología embrionaria con la tasa de desarrollo en cultivo para predecir un posible embarazo. Estudios posteriores determinan la importancia de instaurar un punto crítico a la hora de maximizar las diferencias entre embriones. La importancia de establecer la cronología del desarrollo se describe previamente en modelos animales donde se observa que los embriones que se dividen antes por primera vez, tienen más posibilidades de evolucionar a blastocisto y un mayor porcentaje de viabilidad en el momento de ser transferidos (Lonergan et al. 1999).

Los mecanismos subyacentes al vínculo establecido entre primera división y desarrollo embrionario no se han descrito pero sí se han propuesto varias explicaciones como que la transición desde un ovocito fecundado hasta un embrión de 2-células depende de una secuencia altamente regulada de procesos celulares, la fidelidad en la replicación del DNA, el grado de madurez del ovocito y un conjunto de características intrínsecas a los gametos (Fenwick et al. 2002).

El fenómeno de la división temprana y su impacto sobre las tasas de gestación es estudiado por primera vez por Edwards (Edwards et al. 1984); a partir de este momento se publican numerosos estudios en los que el punto de partida es que la transferencia de embriones con división temprana mejora las tasas de gestación e implantación. La mayoría de estudios relacionados con la división temprana compara los resultados de ciclos donde se transfiere al menos un embrión con división temprana con los datos de ciclos donde solo se transfieren embriones “no división temprana” de modo que resulta bastante complicado saber qué embrión ha implantado. Para resolver esta cuestión, algunos grupos de investigación se centran en las transferencias homogéneas, donde se transfieren embriones de una sola clase (Van Montfoort et al. 2004); estos trabajos

demuestran claramente el aumento en las tasas de gestación e implantación a favor de los embriones con división temprana.

Por lo tanto, se puede asumir que el estudio de la cinética de desarrollo ayuda a discriminar entre embriones de similares características potenciando las diferencias existentes entre ellos. Sin embargo, por las propias características derivadas de las condiciones de cultivo, el seguimiento del desarrollo embrionario es intermitente, por lo que se puede acabar perdiendo precisión en los resultados relacionados con las divisiones embrionarias; la fijación arbitraria de los tiempos de observación del desarrollo embrionario puede derivar en cierta confusión a la hora de categorizar el estadio y la cronología del desarrollo. Con la introducción del time-lapse y del análisis digitalizado de las imágenes, no solo se obtiene una visión completa del desarrollo embrionario sino que se puede determinar con total precisión los tiempos de división embrionaria y cualquier fenómeno intracelular circundante a la fecundación. El análisis no invasivo del desarrollo embrionario basado en la aplicación del time-lapse, es útil no sólo para conocer los sucesos morfológicos asociados a la fecundación, sino también para evaluar la importancia fisiológica de los mismos durante las primeras etapas del desarrollo embrionario.

Recientemente, y gracias al análisis de la cinética embrionaria mediante time-lapse, se ha podido establecer un patrón cronológico del desarrollo embrionario cuyo resultado puede aplicarse como marcador pronóstico del potencial de implantación. Combinando criterios morfológicos con criterios cinéticos, se ha descrito una correlación entre el tiempo que invierte el embrión para alcanzar cada una de las variables de tiempo consideradas y su posterior potencial de implantación (Meseguer et al. 2011), identificándose un rango óptimo de tiempo para cada división embrionaria. Se observan importantes diferencias en la evolución temporal del desarrollo embrionario entre los embriones que implantan y los que no. Los datos obtenidos revelan la presencia de una dinámica de desarrollo de los embriones transferidos que se traduce en un elevado potencial de implantación. Los embriones que se dividen en los puntos intermedios tienen más perspectivas de desarrollo que aquéllos que lo hacen o muy pronto o muy tarde, de manera que se puede confirmar la hipótesis según la cual la competencia embrionaria

depende de una secuencia altamente regulada de procesos celulares que se inician en el mismo momento de la fecundación.

Dentro de las variables de tiempo analizadas, se observa que no sólo son importantes los puntos exactos de división celular, sino también el tiempo transcurrido entre los sucesivos ciclos celulares. Tomando la tasa de implantación como variable principal del trabajo, no sólo se demuestra la competencia del embrión para desarrollarse a blastocisto sino también de los acontecimientos posteriores como el “hatching”, de modo que, en última instancia, la integración de parámetros morfológicos con variables cinéticas permite detectar los factores más tardíos del desarrollo embrionario que ayudan a predecir la competencia embrionaria.

Con este trabajo se demuestra la incorporación del análisis de imagen a la rutina diaria de un laboratorio de Embriología. Se aporta por primera vez información novedosa acerca de los parámetros morfocinéticos del desarrollo que determinan que un embrión implante o no, contribuyéndose con evidencias claras a demostrar que los intervalos de tiempo en los que se mueven los embriones son mínimos en comparación con la amplia variedad de resultados que pueden adoptar los embriones que no implantan. Sin embargo, a pesar de la importancia derivada de la cronología del desarrollo en relación a la futura competencia embrionaria, no hay que olvidar la coexistencia con otros factores que también condicionan el propio proceso de implantación. Por ejemplo, un embrión puede estar incluido en las mejores categorías tanto morfológicas como cinéticas y no implantar, simplemente porque el embrión no esté preparado.

Por lo tanto, podemos concluir que los parámetros morfocinéticos actúan como filtro para la selección de los embriones con mayor/menor potencial de implantación. La descripción de rangos de tiempo óptimos en combinación con unas categorías morfológicas concretas supone el primer intento de desarrollar un modelo de selección embrionaria incorporando la información derivada del uso de un sistema de análisis de imagen.

OBJETIVOS

El uso de las técnicas de reproducción asistida ha aumentado progresivamente en las tres últimas décadas y, en los países desarrollados, suponen un porcentaje importante de los nacimientos anuales. En un intento por compensar la ineficacia de los procedimientos de FIV, las pacientes pasan por un proceso de estimulación ovárica con altas dosis de gonadotropinas exógenas que permiten la recuperación de múltiples ovocitos en un único ciclo. Aunque la estimulación ovárica desempeña una función importante en las técnicas de reproducción, también implica la aparición de efectos perjudiciales en la ovogénesis, calidad embrionaria, receptividad endometrial y resultados perinatales.

Con estas premisas, los objetivos del estudio son:

1.- en un programa de donación de ovocitos, establecer si los protocolos de estimulación (agonistas vs. antagonistas) ejercen una influencia sobre la cinética y morfología del desarrollo embrionario evaluado a partir de un sistema integrado de análisis de imagen.

2.- a través de un tecnología de time-lapse, determinar si los preparados gonadotrópicos empleados en la estimulación ovárica (FSH recombinante, HMG y FSH+HMG) afectan a los tiempos de división celular y en consecuencia repercuten sobre las características morfocinéticas de los embriones en ciclos de donación de ovocitos.

3.- comprobar si las dosis de gonadotropinas aplicadas y los niveles de hormonas esteroideas en sangre (estradiol y progesterona) el día de la inducción de la ovulación condicionan la calidad y tasa de desarrollo embrionario mediante el uso de tecnología time-lapse en donantes de ovocitos.

MATERIAL Y MÉTODO

1. Donación de ovocitos.

1.1 Selección de las donantes.

Los ovocitos donados proceden de mujeres que desean donar sus óvulos de forma altruista al ser informadas sobre el programa. Con respecto al propio proceso de donación, hay que tener en cuenta que según la legislación vigente en España:

- la donación debe ser anónima y no tener carácter lucrativo y/o comercial.
- la edad de las donantes debe estar entre 18-35 años.
- las donantes deben gozar de buen estado psicofísico y carecer de antecedentes personales o familiares de enfermedades hereditarias (vasculopatías, ceguera, artritis grave, diabetes juvenil), esquizofrenia, depresión, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, alcoholismo, etc.
- las donantes deben presentar serologías negativas para sífilis, toxoplasma, rubéola, gonorrea, *Chlamydia*, hepatitis B, hepatitis C y VIH determinado previamente al inicio de la estimulación.
- además, en el IVI se han introducido una serie de requisitos adicionales como la confirmación de que la donante debe presentar un cariotipo normal (46, XX),
- asimismo debe garantizarse en la medida de lo posible, la máxima similitud fenotípica e inmunológica (grupo sanguíneo y Rh) de la donante con la pareja receptora y su entorno familiar; también se recomienda realizar un estudio hematológico completo para descartar riesgo de transmisión de beta-talasemia.

1.1.1 Consentimiento informado.

Las donantes de ovocitos deben firmar un consentimiento informado que les será entregado por el centro, en el que figurarán los fines y consecuencias del acto, así como los procedimientos y estudios a los que se verá sometida la donante.

1.1.2 Protocolos de estimulación.

- **protocolo largo con agonistas de la GnRH.** Se induce la supresión hipofisaria con el agonista de la GnRH desde el día 21-22 del ciclo anterior (mitad de fase luteínica), acortando esta fecha si el ciclo menstrual de la donante es inferior a 28 días. La dosis inicial es de 1 miligramo diario y puede administrarse vía parenteral o intranasal. En la práctica diaria se trabaja habitualmente con tres preparados comerciales:

- Procrin (Abbott, Madrid, España): 1 miligramo de acetato de leuprorelina, (0.2 ml/día) por vía subcutánea.

- Synarel, spray nasal (Pfizer, Madrid, España): nafarelina, 2 inhalaciones cada 12 horas (200 µg/inhalación), una en cada orificio nasal.

- Decapeptyl 0.1, (Decapeptyl®; Ipsen Pharma, Barcelona España). Una inyección subcutánea diaria.



Figura 7. Protocolo largo con agonistas de la GnRH

La dosis se reduce a la mitad en el momento de la menstruación, momento que también coincide con el inicio de la estimulación con gonadotropinas. Si los ciclos de la donante no son regulares y el ciclo previo está programado con anticonceptivos orales, el agonista se inicia con la pastilla 14-17.

Tras la menstruación, espontánea o tras tratamiento con anticonceptivos, se evidencia la supresión hipofisaria mediante:

- control ecográfico de los ovarios para comprobar que se encuentran en reposo descartando la presencia de folículos mayores de 10 mm.

- nivel de estradiol en sangre inferior a 60 pg/ml en el caso de que se cuestione el reposo ovárico por la presencia de imágenes quísticas en los anejos.

Una vez que se ha comprobado la supresión hipofisaria se inicia el tratamiento con gonadotropinas el segundo-tercer día del ciclo. La dosis inicial varía entre 150-300 UI de FSH recombinante (Gonal-F®; Serono, Madrid, España; Puregon®; MSD, Madrid, España) o urinaria (Fostipur®; Angelini, España) y/o de HMG (Menopur®; Ferring Pharmaceuticals, Madrid, España; HMG-Lepori®, Angelini, España) durante 5 días en función de la edad, el índice de masa corporal y la respuesta obtenida en ciclos previos; tras el primer control ecográfico, se puede modificar la dosis en función de la respuesta ovárica.

Una vez que la respuesta folicular es adecuada y ecográficamente se advierten 3 ó más folículos de 18 mm de diámetro, se induce la ovulación con hCG (Ovitrelle®, 250 µg; Merck-Serono, Madrid, España).

Una variante de esta fórmula es el protocolo largo con agonistas a mitad de dosis, cuyo objetivo es contrarrestar el efecto supresor de los agonistas; en este caso, se recomienda reducir la dosis y la duración de la administración de los agonistas, iniciándolos en el mismo momento del ciclo pero a mitad de dosis para mantener la ventaja de su uso y evitar una supresión ovárica profunda.

- **protocolo corto con antagonistas de la GnRH.** En este caso se sigue el esquema de protocolo de dosis múltiple con pauta flexible.

El segundo-tercer día de ciclo, tras una regla espontánea o provocada con tratamiento anticonceptivo, se inicia tratamiento con gonadotropinas con una dosis inicial de FSH recombinante (Gonal-F®; Serono, Madrid, España; Puregon®; MSD, Madrid, España), FSH urinaria (Fostipur®; Angelini, España) y/o de HMG (Menopur®; Ferring Pharmaceuticals, Madrid, España; HMG-Lepori®, Angelini, España) que varía entre 150-300 UI dependiendo de la edad, el índice de masa corporal y la respuesta obtenida en ciclos previos; cuando ecográficamente se observa un folículo mayor de 14 mm de diámetro se introduce el antagonista a dosis de 0.25 mg/día (Cetrotide®; Merck-Serono, Madrid, España; Orgalutran®; MSD, Barcelona, España).

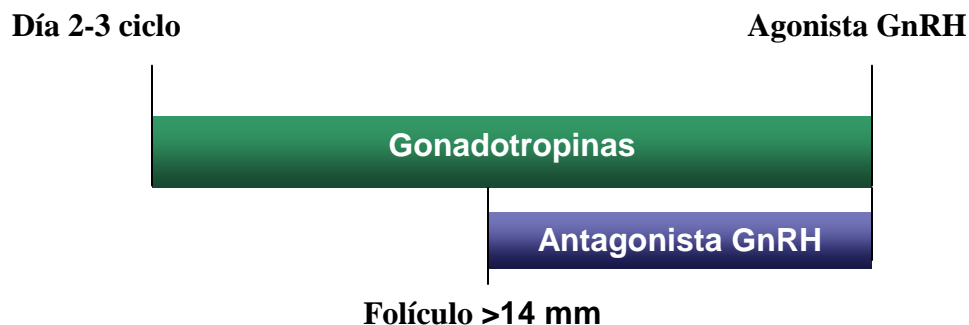


Figura 8. Protocolo con antagonistas de la GnRH.

Cuando se observa una respuesta folicular adecuada (3 ó más folículos de 18 mm de diámetro) se procede a desencadenar la ovulación un agonista de la GnRH en una única dosis de 0.1 mg (Decapeptyl®; Ipsen Pharma, Barcelona, España).

1.2 Receptoras.

El objetivo del tratamiento hormonal sustitutivo (THS) en las receptoras de ovocitos es conseguir un desarrollo normal del endometrio para permitir la implantación embrionaria y el mantenimiento de las primeras etapas del embarazo. La preparación endometrial ha sido imprescindible para el éxito de los programas de donación ovocitaria, ya que el endometrio debe encontrarse en un estado óptimo de receptividad para llevar a cabo la implantación; actualmente con los programas de criopreservación ovocitaria es posible llevar a cabo la transferencia embrionaria en ciclo natural sin precisar ningún tipo de preparación adicional.

1.2.1 Preparación endometrial

- **receptoras con función ovárica.** La función ovárica de las receptoras puede influir negativamente en la preparación endometrial en caso de que se desarrolle un endometrio secretor antes de que se produzca la donación. En esta situación se utilizan agonistas/antagonistas de la GnRH con el fin de neutralizar la producción endógena de gonadotropinas y evitar su interferencia en los ciclos de donación de ovocitos.

Se administra un agonista de depósito (Decapeptyl® 3.75; Ipsen Pharma, Barcelona, España) en la mitad de la fase lútea del ciclo anterior; tras la menstruación se

inicia la administración de valerianato de estradiol (Progynova®; Schering España, Madrid, España) a dosis crecientes: 2 mg los primeros 8 días de tratamiento, 4 mg los siguientes 3 días y 6 mg desde aproximadamente el día 12 de ciclo. La inhibición hipofisaria también puede lograrse mediante la administración de un antagonista de la GnRH; durante el ciclo previo se administra un anticonceptivo, se realiza una ecografía para comprobar el reposo ovárico y se introduce el antagonista desde el primer día de regla y durante 7 días por vía subcutánea (0.25 mg diarios de Cetrotide® (Merck-Serono, Madrid, España) junto con un suplemento de carácter estrogénico desde el tercer día de la menstruación (Evopad® 75, Janssen-Cilag, Madrid, España) a razón de dos parches cada tres días.

En el día 15-16 de la THS o antes si resulta necesario, se realiza un primer control ecográfico para determinar el grosor endometrial; asimismo, se valoran las concentraciones de estradiol.

Una alternativa en este tipo de receptoras es la posibilidad de transferir en ciclo natural, en el que comienza a administrarse la progesterona el mismo día de la ovulación

-receptoras sin función ovárica. Se aplica el protocolo descrito anteriormente excepto la administración de análogos de la GnRH para inhibir la hipófisis.

1.2.2 Administración de progesterona. Administración de progesterona micronizada por vía vaginal (800 mg/día de Progeffik®; Effik, Madrid, España; Utrogestan®; Seid, Barcelona, España)) desde el día después de la donación.

1.2.3 Duración de la fase estrogénica. La fase de preparación endometrial con estrógenos debe durar al menos 10 días y puede prolongarse más allá de los 12-14 días que suele durar la fase folicular del ciclo natural. En el IVI, el protocolo de sustitución estrogénica empleado en la actualidad consiste en la administración prolongada de estrógenos más allá del momento en el que se efectúa la donación de ovocitos. Esta fórmula facilita al máximo la sincronización entre donantes y receptoras.

Aunque no se ha estudiado el efecto directo de los estrógenos sobre las capacidades morfológicas y funcionales del endometrio, éste tolera la exposición a

diferentes dosis de estradiol e incluso concentraciones suprafisiológicas no influyen de forma negativa sobre la preparación endometrial (Younis et al. 1996)

1.2.4 Controles durante la fase estrogénica. Evaluación del grosor endometrial y de los niveles de estradiol en la valoración de la preparación endometrial. Se realiza un primer control ecográfico cuando ya se están administrando 6 mg de valerianato de estradiol, a los 12-14 días de haber iniciado la THS, y luego de forma semanal hasta el momento de la transferencia embrionaria.

1.2.5 Sangrado durante la fase estrogénica. El sangrado está asociado a un descenso en las tasas de implantación, de modo que ante este tipo de situación, se induce la menstruación por privación hormonal. En el caso de que la paciente presente función ovárica, se recomienda repetir la dosis de análogo en el momento de la hemorragia y añadir progesterona micronizada por vía vaginal (800 mg/día) durante 5 días manteniendo los estrógenos. Tras completar la medicación, se suspende y se espera la menstruación; de esta manera, nos encontramos ante el inicio de un nuevo ciclo con la paciente ya frenada. Si la mujer careciera de función ovárica, únicamente se procedería a la administración de progesterona durante 5 días.

La identificación de una serie de factores de riesgo relacionados con las probabilidades de sangrado permite establecer un turno preferente en el tiempo de espera con el objetivo de evitar esta situación.

1.3 Sincronización del ciclo donante – receptora.

El programa de donación de ovocitos puede gestionarse de dos formas:

1.- tanto donantes como receptoras inician la estimulación ovárica y la terapia hormonal sustitutiva (THS) según sus ciclos menstruales; cuando hay una donación, se destinan los ovocitos a una receptora compatible en grupo sanguíneo y características fenotípicas cuyo endometrio esté preparado para recibir a los embriones.

2.- coordinación de ciclos; se determina una pareja donante-receptora según la compatibilidad de grupo sanguíneo y Rh, características físicas y otros criterios de optimización en función de los detalles del historial clínico de la receptora.

Una vez establecida la asociación entre la donante y la receptora, se coordinan los ciclos de ambas para que la estimulación ovárica de la donante y la preparación endometrial de la receptora se lleven a cabo al mismo tiempo. Se consideran dos tipos de receptoras: con función ovárica conservada (con THS o en ciclo natural) y sin función ovárica.

Para la coordinación de ambos ciclos se aplica el siguiente protocolo:

1.3.1 Donante.

- anticonceptivo hormonal desde el ciclo previo.
- se fija fecha de inicio del análogo de la GnRH en caso de un protocolo largo con agonistas y del fin de la anticoncepción hormonal según la fecha de inicio de la estimulación prevista por el programa de gestión de ciclos.
- ecografía de control previa al inicio de la estimulación según protocolo y los controles necesarios durante la estimulación.

1.3.2 Receptora.

- ecografía de control antes de la THS para comprobar la regularidad de la cavidad endometrial y el reposo ovárico.
- inicio de la THS aproximadamente dos días antes de que la donante inicie la estimulación. Es importante no prolongar la THS más de lo necesario.
- primer control de la línea endometrial 8-10 días después del inicio de la THS ajustando la dosis de estrógenos según resultado ecográfico, niveles de estradiol sérico y/o de ambos.
- programación de los controles semanales y/o del día de la donación.

2. Punción ovárica y recuperación de ovocitos

Se realiza punción folicular guiada por ecografía vaginal en condiciones adecuadas de asepsia entre 35-36 horas después de haber administrado el agente desencadenante de la ovulación, anticipándonos al proceso ovulatorio. Por lo general, se emplea anestesia general, que consiste en una sedación para la que se suele emplear:

- propofol (2-3 mg/kg), a una velocidad de 3-4 ml/minuto, repitiendo bolos de 20-50 mg dependiendo del tiempo de la punción.

- atropina 0.5 mg.

- fentanilo 0.75 mg como analgésico intravenoso.

- monitorización de la paciente vía pulsioxímetro.

- analgésicos por vía intravenosa una vez que ha finalizado la punción.

Tras abundante lavado con suero fisiológico, se anestesia a la paciente y utilizando una aguja de punción ovárica de 18G (Kitazato Medical, Tokio, Japón) se puncionan uno a uno los folículos aspirando su contenido en tubos específicos para la recogida de líquido folicular (Falcon 2057, Becton Dickinson, Reino Unido) con un sistema de vacío a 140 mm Hg.

El contenido del folículo aspirado se transporta rápidamente al laboratorio contiguo al quirófano para comprobar de inmediato la presencia del complejo cúmulo-corona-ovocito en el líquido recuperado. Los ovocitos recuperados se lavan en HEPES (Global, Canadá) y se cultivan individualmente en gotas de 50 µl en FERT (Global, Canadá) a 6.0% CO₂ y 37.4 °C durante 4 horas. La decumulación se lleva a cabo de forma mecánica en una solución de proporción 1:1 con hialuronidasa y medio de cultivo.

3. Obtención y procesamiento de las muestras de semen.

La muestra se obtiene por masturbación y se analiza de acuerdo a los criterios especificados por la Organización Mundial de la Salud (Cooper et al. 2009).

La elección de la técnica adecuada para la preparación del semen en un tratamiento de reproducción asistida viene dictada por la naturaleza de la propia muestra. La recuperación de espermatozoides móviles se lleva a cabo mediante la técnica de “swim up” en los ciclos de ICSI y aplicando un protocolo de centrifugación en gradientes de densidad en ciclos con muestras congeladas.

El “swim up”, utilizado en muestras frescas para ciclos de ICSI, se basa en el hecho de que sólo los espermatozoides con buena movilidad son capaces de ascender al sobrenadante (Harris et al. 1981) mientras que el fundamento de los gradientes de densidad (muestras congeladas) se halla en la selección de los espermatozoides que pueden vencer la dificultad que presentan los gradientes de densidad de 90% y 45% y

llegar hasta el fondo del tubo, además de actuar como filtro para el plasma seminal, células redondas, detritus y espermatozoides de movilidad no progresiva o inmóviles (Gorus and Pipeleers 1981).

4. Técnicas de fecundación in vitro.

Como se ha comentado previamente, conforme el aspirado folicular llega al laboratorio se inicia la búsqueda e identificación de los ovocitos. Una vez que se han identificado y aislado permanecen en cultivo (FERT, Global, Canadá) a 37.4°C y 6.0% CO₂ hasta el momento del ICSI.

4.1. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). La fecundación mediante esta técnica requiere la decumulación de los ovocitos, es decir, la eliminación de las células de la corona y el cúmulo que lo rodean. Esta estrategia permite no sólo la inyección precisa de los ovocitos sino también la valoración de su grado de madurez, hecho de crítica importancia para la realización del ICSI.

La decumulación se lleva a cabo combinando procedimientos enzimáticos y mecánicos; para decumular se sumerge el complejo cúmulo-corona-ovocito en una solución con hialuronidasa en proporción 1:1 durante 20-30 segundos aspirando varias veces el complejo a través de la pipeta.

Se prepara la placa de microinyección que consta de microgotas individuales en las que se coloca a los ovocitos; a continuación, se añaden varias gotas con una suspensión de PVP (polivinil-polirridona) y finalmente, entre 1-3 µl del capacitado espermático. El carácter viscoso del PVP ralentiza la movilidad de los espermatozoides, facilitando su manipulación y en consecuencia su captura; también permite un mejor control del fluido en la aguja de inyección y previene que los propios espermatozoides se queden adheridos a la pipeta. Para la microinyección, se trabaja con un microscopio invertido con óptica Hoffman (Olympus) con pletina calefactada y un equipo de micromanipulación. Con la pipeta de sujeción, se mantiene fijo al ovocito mientras que con la pipeta de inyección se aspiran espermatozoides morfológicamente normales que se inyectan en el ovocito teniendo en cuenta la posición del corpúsculo polar para evitar dañar el huso meiótico.

5. Análisis de la fecundación y evaluación del desarrollo embrionario siguiendo criterios de valoración convencional.

La fecundación se valora 16-18 horas después de la microinyección (hpi), siendo la característica más importante la presencia de dos pronúcleos y dos corpúsculos polares.

Se realiza un seguimiento del desarrollo embrionario en día 2 - día 3 teniendo en cuenta el número de células, el porcentaje y tipo de fragmentación, la simetría y la multinucleación. De acuerdo a las características de cada embrión el día de desarrollo considerado, se califica a los embriones en (Prados et al. 2008):

- **embriones óptimos:** en día 2 se caracterizan por tener 4 células simétricas, menos del 10% de fragmentación y no estar multinucleados, mientras que en día 3 presentan 7-8 células simétricas y menos del 10% fragmentación.

- **embriones subóptimos:** en día 2 cuentan con 2, 3 ó 5 células mientras que en día 3 tienen menos de 6 células o más de 9 células. Además se caracterizan por estar ligeramente desorganizados o ser asimétricos, presentan anomalías en la zona pelúcida, entre 10-30% fragmentación y pequeñas vacuolas.

- **embriones anormales:** acumulación de las características anteriores, bloqueados, en día 2 con más de 6 células y en día 3 con más de 12 células, fragmentación de tipo IV o superior al 35%, más del 30% de la superficie total del embrión está vacuolada, está multinucleado en día 2, hay blastómeras degeneradas o con el citoplasma contraído y se aprecia una célula dominante que representa más del 50% del tamaño total del embrión.

En cuanto a la valoración morfológica del blastocisto tendremos en cuenta las características de la masa celular interna (MCI) y el trofoectodermo (TE). La masa celular interna puede adoptar cuatro manifestaciones distintas: tipo A: compacta, con muchas células y bien definida; tipo B: varias células agrupadas y de aspecto laxo; tipo C: muy pocas células; y tipo D: ausente o degenerada. El TE clasifica según el número de células que se observan: tipo A: completo y formado por muchas células; tipo B: incompleto y con alguna zona lineal; tipo C: formado por pocas células; tipo D: con células degeneradas.

6. Transferencia embrionaria.

La transferencia embrionaria constituye el último paso en el proceso de fecundación *in vitro*. La transferencia intrauterina vía vaginal es el procedimiento mas empleado e incluye dos aspectos a valorar: el día y el número de embriones que se van a transferir; este último punto depende fundamentalmente de la edad de la paciente, de su historia clínica y de la calidad de la cohorte embrionaria.

La transferencia se realiza en condiciones de asepsia y es importante que el quirófano se encuentre lo más cerca posible del laboratorio de Embriología para reducir al mínimo el recorrido de los embriones manteniendo así las condiciones óptimas para una buena transferencia. Se depositan los embriones a través de la vagina, canalizando el cérvix uterino con una cánula blanda Wallace (SIMS Portex Limited, Reino Unido) hasta llegar al tercio superior de la cavidad endometrial, se descargan y se comprueba que no han quedado retenidos en ella.

7. Sistema de análisis de imagen. El Embryoscope.

Para realizar el análisis de calidad de los embriones mediante time-lapse, hemos utilizado un sistema que consta de una cámara CCD monocroma, un dispositivo Leica 20x con un objetivo de contraste de óptica Hoffmann LWD 0.40; incorpora iluminación de tipo LED de 635 nm y un tiempo total de exposición diaria a la luz inferior a 50 segundos, de modo que los riesgos de fotooxidación como consecuencia de exponer los embriones a la luz son prácticamente nulos.

Los sistemas de análisis de imagen minimizan las perturbaciones transitorias del cultivo embrionario integrando en un mismo sistema las condiciones de cultivo y la posibilidad de evaluar los embriones.

En concreto, se ha utilizado el Embryoscope (Unisense Fertilitech, Aarhus, Dinamarca) entre cuyas prestaciones destaca la posibilidad de captar imágenes de alta resolución con frecuencia programable (en este trabajo, cada 20 minutos) en múltiples planos focales con una capacidad de hasta 72 embriones distribuidos en 6 placas de 12 pocillos cada una. Trabaja como un incubador convencional con la ventaja añadida de registrar en tiempo real una serie de variables clave para el desarrollo embrionario sin necesidad de manipular los embriones ni alterar sus condiciones de cultivo.

7.1 Placas del Embryoscope. El Embryoscope cuenta con una capacidad de 6 placas para 12 embriones cada una; el diseño incluye 12 pocillos individualizados con una depresión central de 250 μm (micropocillo) que es donde se va a alojar el embrión y que coincide con la posición en la que la cámara va a tomar las imágenes.

El seguimiento de cada embrión se ve facilitado gracias al número que figura debajo de cada pocillo y que es posible leer durante la manipulación de los embriones fuera del incubador.



Figura 9. El Embryoscope

7.2 Preparación placas Embryoscope. Las placas se preparan con un día de antelación para gasear y equilibrar correctamente los medios.

- se lava la placa con 1.4 ml del mismo medio de cultivo post-microinyección. En este paso es imprescindible la eliminación de burbujas, las cuales dificultan que el embrión se aloje correctamente en el fondo del micropocillo y distorsionan la toma de imágenes.

- se retira el medio de la placa a excepción de la mínima cantidad que queda en el micropocillo y se llena cada pocillo individualmente con 25 μl del mismo medio de cultivo.

- por último se añaden 1.2 ml de aceite mineral para evitar problemas de evaporación.

El cambio de medio de cultivo se realiza periódicamente del mismo modo que en los cultivos normales (día 1, día 3 y día 5), para lo cual procedemos a la preparación de placas nuevas según el método descrito anteriormente.

7.3 EmbryoViewer. El soporte informático anexo al incubador tiene como objetivo ayudar al embriólogo en la selección de los embriones de mayor calidad. Es importante recordar que el software no realiza ningún tipo de diagnóstico sino que únicamente recoge todos los datos procedentes del Embryoscope y los datos introducidos por el usuario.

El programa informático incluye un conjunto de aplicaciones para realizar anotaciones de cada embrión individualmente, es capaz de controlar condiciones de cultivo relacionadas con la temperatura y la concentración gaseosa y permite la exportación de datos para un posterior análisis estadístico.

Las imágenes y datos procedentes del Embryoscope pueden visualizarse en el EmbryoViewer que puede utilizarse para revisar y comparar secuencias de imágenes sincronizadas de diferentes embriones. Además, el EmbryoViewer contiene una sencilla base de datos que permite al usuario registrar y guardar todas las anotaciones relacionadas con las características morfológicas y el desarrollo embrionario, historia clínica de la paciente, protocolos de estimulación y resultados de los ciclos.

7.4 El Embryoscope en el laboratorio de FIV. Con el objetivo de estudiar el desarrollo embrionario los embriones derivados de ICSI se introducen en el Embryoscope el mismo día de la fecundación (día 0), y se mantienen en el dispositivo de análisis de imagen hasta la transferencia embrionaria (día 3 ó día 5) según el tipo de cultivo y la indicación del tratamiento.

Las series de imágenes se analizan en tiempo real con el EmbryoViewer, el cual ofrece una gráfica que refleja la cantidad de movimiento que se ha producido entre dos imágenes consecutivas de la filmación; este parámetro se denomina actividad blastomérica, se genera de forma automática y suele indicar los puntos en los que se produce movimiento durante el desarrollo que normalmente coincide con las divisiones embrionarias.

8. Variables y grupos de estudio

8.1 Variables independientes. El **primer objetivo** de este trabajo es estudiar el efecto de los protocolos de estimulación sobre la cinética de desarrollo embrionario; con este propósito, todos los ciclos son estimulados con FSH y se crean los siguientes grupos de estudio:

- Agonistas GnRH/hCG: 103 ciclos estimulados con un protocolo largo con agonistas de la GnRH e inducción de la ovulación con hCG (716 embriones analizados).
- Antagonistas de la GnRh/agonistas de la GnRH: 297 ciclos estimulados con un protocolo con antagonistas de la GnRH y agonistas de la GnRH como agentes para desencadenar la ovulación (2101 embriones analizados)

El **segundo objetivo** implicaba evaluar el posible impacto del tipo de gonadotropinas sobre la velocidad de desarrollo embrionario En 310 ciclos (2132 embriones) tratados con un protocolo largo con agonistas de la GnRH, se crean las siguientes categorías de trabajo:

- Estimulación con FSH recombinante (r FSH). N=103
- Estimulación con HMG. N=96
- Estimulación con FSH+HMG. N=111

En el último y **tercer objetivo** se pretende describir la distribución de la cinética embrionaria de acuerdo a las dosis de gonadotropinas empleadas para la estimulación ovárica y las concentraciones de estradiol y progesterona en suero el día en el que se induce la ovulación. Se convierte una variable cuantitativa en una variable categórica mediante un sistema basado en una serie de ordenaciones que derivan en cuatro categorías con igual número de embriones en cada una de ellas. Con este procedimiento, se eliminan posibles sesgos y se permite el estudio de la distribución temporal de los embriones. Para realizar estas observaciones, se estudian los protocolos en los que se han utilizado antagonistas de la GnRH para la supresión hipofisaria, y agonistas para inducir la ovulación, en un total de 295 ciclos (2044 embriones analizados). Para cada una de las variables estudiadas, se obtienen los siguientes grupos de estudio:

- Dosis de FSH recombinante. Se estudia la distribución embrionaria en las siguientes categorías: ≤ 1500 UI/L; 1501-2000 UI/L; 2001-2400 UI/L; ≥ 2401 UI/L.

- Niveles de estradiol sérico el día de la inducción de la ovulación. Los embriones quedan repartidos en los siguientes cuartiles: ≤ 1404 pg/ml; 1405-2000 pg/ml; 2101-2999 pg/ml; ≥ 3000 pg/ml.

- Niveles de progesterona sérica el día de la inducción de la ovulación. Se evalúa la distribución cronológica de los embriones en los siguientes intervalos: ≤ 0.5 ng/ml; 0.501-0.8 ng/ml; 0.801-1.1 ng/ml; ≥ 1.11 ng/ml.

8.2 Variables dependientes. Las series de imágenes se analizan automáticamente en tiempo real mediante el software incorporado en el Embryoscope.

- **actividad blastomérica:** representación gráfica que refleja la cantidad de movimiento entre dos imágenes consecutivas captadas por el sistema de time-lapse. Los picos registrados durante este periodo indican el momento de las divisiones celulares.

- **t0 (h):** tiempo de microinyección.

- **t2 (h):** tiempo de la división hacia un embrión de 2-células.

- **t3 (h):** tiempo de la división hacia un embrión de 3-células

- **t4 (h):** tiempo de la división hacia un embrión de 4-células.

- **t5 (h):** tiempo de la división hacia un embrión de 5-células.

- **t6 (h):** tiempo de la división hacia un embrión de 6-células.

- **t7 (h):** tiempo de la división hacia un embrión de 7-células.

- **t8 (h):** tiempo de la división hacia un embrión de 8-células.

- **t9 (h):** tiempo de la división hacia un embrión de 9-células.

- **M (h):** tiempo de compactación: masa esférica maciza en la que no se distinguen los contornos celulares y que representa una fase intermedia entre el cigoto y el blastocisto.

- **B (h):** tiempo de aparición de la cavidad blastocélica: en una masa esférica de células es posible distinguir una cavidad central llena de líquido.

- **BE (h):** tiempo que se precisa para alcanzar la etapa de blastocisto expandido.

A partir de estos resultados se obtienen una serie de valores derivados relacionados con la duración de los ciclos celulares:

- **CC2 (h)** = $(t_3 - t_2)$ = duración del segundo ciclo celular; periodo de tiempo en el que observamos un embrión de 2-células.

- **CC3 (h)** = $(t_5 - t_3)$ = tiempo que tarda el embrión en la transición de 3-células a 5-células.

- **S2 (h)** = $(t_4 - t_3)$ = sincronía en la transición desde un embrión de 3-células a un embrión de 4-células.

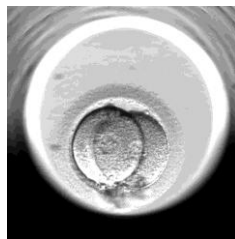
- **S3 (h)** = $(t_8 - t_5)$ = tiempo que tarda el embrión en pasar de un estadio de 5-células a uno de 8-células.

- **(t4-t2) (h)**: tiempo medio de la segunda división embrionaria.

- **(t8-t4) (h)**: tiempo medio de la tercera división embrionaria.



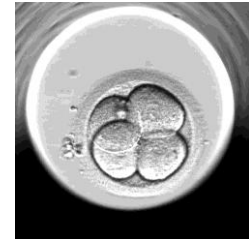
t0



t2



t3



t4



t5



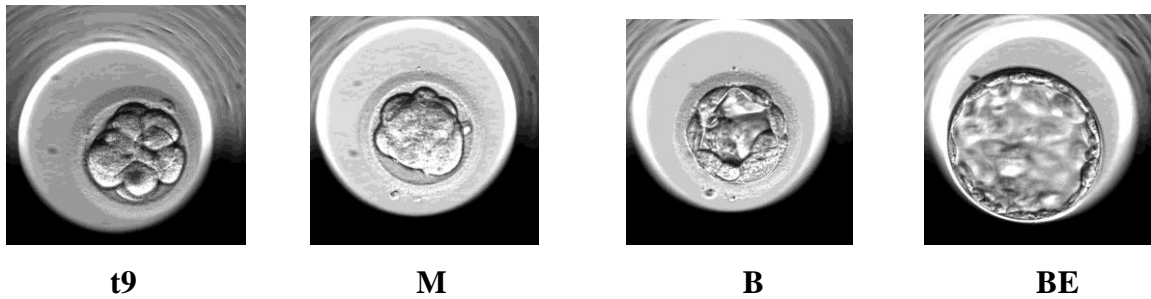
t6



t7



t8



Gracias a la enorme cantidad de datos que genera el Embryoscope, se desarrolla un algoritmo que define la calidad de un embrión con un 10% más de posibilidades de implantar si su cinética de división embrionaria se ajusta a unos valores concretos (Meseguer et al. 2011). Teniendo en cuenta estos rangos óptimos de tiempo, se establecen las siguientes variables con un elevado poder de predicción del potencial de implantación: T5: 48.8-56.6 h; S2: <0.75 h; CC2: <11.9h.

Se definen como embriones óptimos a aquellos embriones cuyos tiempos de división embrionaria se encuentran dentro de estos rangos óptimos de tiempo y que tienen, al menos, un 10% más de potencial de implantación.

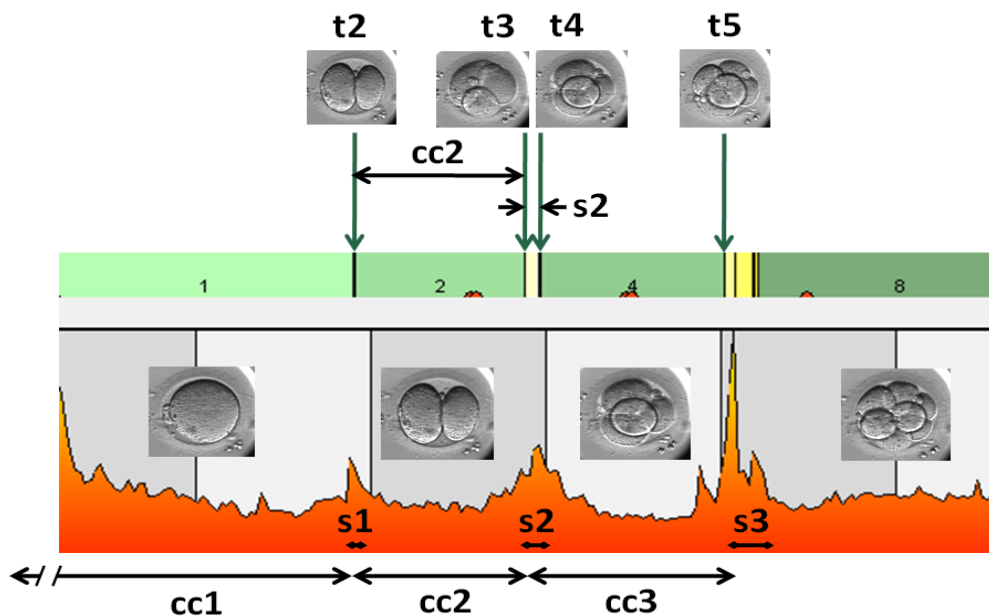


Figura 10. Intervalos de tiempo determinados mediante tecnología de time-lapse

-Categorías morfocinéticas. La clasificación jerárquica propuesta por Meseguer comienza con un examen morfológico de todos los embriones para descartar a aquéllos que claramente no son viables; estos embriones no se tienen en cuenta en el momento de la transferencia embrionaria y se descartan (categoría F). En el siguiente paso, se excluyen los embriones que cumplen con alguno de los siguientes criterios de exclusión: embriones asimétricos en el estadio de 2-células, división directa de cigoto a embrión de 3-células y multinucleación en 4-células (categoría E).

Las categorías posteriores siguen una estricta jerarquía basada en las variables binarias de tiempo T5, S2 y CC2. En primer lugar, si los valores de T5 están incluidos dentro del intervalo óptimo (48.8-56.6 horas), el embrión se clasifica como A o B; si el valor de T5 se localiza fuera del rango óptimo, el embrión se define como C o D.

Para el caso de S2, si el tiempo de división está dentro del valor adecuado (≤ 0.76 horas), el embrión es A o C dependiendo del valor de T5; de forma parecida, si el valor de S2 está fuera del rango óptimo, el embrión es B o D según T5. Finalmente, el embrión es categorizado con un valor adicional positivo (+) si $CC2 \leq 11.9$ horas (A+/B+/C+/D+) o negativo (-) si $CC2 > 11.9$ horas (A-/B-/C-/D-).

En conjunto, obtendremos las siguientes categorías del algoritmo:

A+: T5, 48.8-56.6 horas; $S2 \leq 0.76$ horas; $CC2 \leq 11.9$ horas.

A-: T5, 48.8-56.6 horas; $S2 \leq 0.76$ horas; $CC2 > 11.9$ horas.

B+: T5, 48.8-56.6 horas; $S2 > 0.76$ horas; $CC2 \leq 11.9$ horas.

B-: T5, 48.8-56.6 horas; $S2 > 0.76$ horas; $CC2 > 11.9$ horas.

C+: T5 \neq 48.8-56.6 horas; $S2 \leq 0.76$ horas; $CC2 \leq 11.9$ horas.

C-: T5 \neq 48.8-56.6 horas; $S2 \leq 0.76$ horas; $CC2 > 11.9$ horas.

D+: T5 \neq 48.8-56.6 horas; $S2 > 0.76$ horas; $CC2 \leq 11.9$ horas.

D-: T5 \neq 48.8-56.6 horas; $S2 > 0.76$ horas; $CC2 > 11.9$ horas.

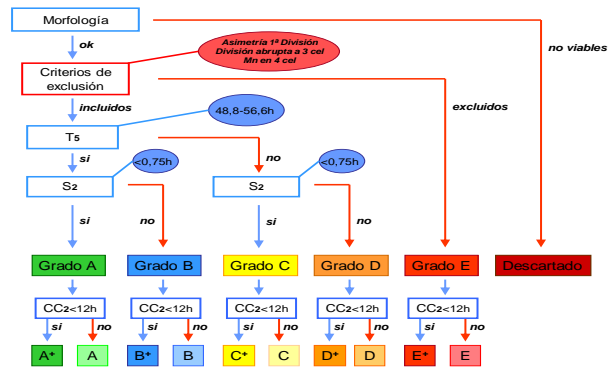


Figura 11. Criterios de clasificación embrionaria.

Además se determinarán los siguientes parámetros reproductivos:

-**tasa de gestación (%)**: proporción de pruebas positivas de embarazo en relación al número total de ciclos con transferencia.

- **tasa de implantación (%)**: número de sacos gestacionales en relación al total de embriones transferidos.

- **tasa de aborto (%)**: número de pérdidas gestacionales en relación al total de gestaciones.

9. Análisis estadístico.

Los resultados fueron analizados de manera retrospectiva. Para describir la cinética de la distribución embrionaria de acuerdo con las dosis totales de gonadotropinas, los niveles de estradiol séricos el día de la administración de la hCG y los niveles séricos de Progesterona el mismo día, convertimos estas variables continuas cuantitativas en variables categóricas, empleando un sistema basado en las ordenaciones que nos dio 4 categorías para cada variable con un número similar de elementos (cuartiles) cuyos valores están descritos en el apartado anterior. Mediante este procedimiento el sesgo en el número total de embriones obtenido en cada categoría o cuartil se evitó. Finalmente los tiempos de división descritos en el apartado anterior se comprobaron en las categorías determinadas por las variables independientes, estos datos fueron analizados por una prueba T de Student para comparar las horas cuando sólo existían dos categorías para la variable independiente y el análisis de la varianza ANOVA cuando la variable dependiente tenía más de 2 categorías en este caso fueron 4.

En el caso de las variables dependientes categóricas, la proporción de cada variable en función de las variables dependientes descritas anteriormente se comparó mediante una Chi-cuadrado para la comparación de proporciones. El valor límite para considerar la prueba significativa fue un valor alfa menor de 0.05. El análisis estadístico se realizó mediante el programa Statistical Package for the Social Sciences 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Los tiempos siempre siguieron una distribución normal en el análisis realizado y por tanto se realizaron los test de naturaleza paramétrica.

RESULTADOS

1. Influencia de los protocolos de estimulación sobre la cinética de desarrollo embrionario

1.1- Cinética embrionaria en función del tipo de protocolo empleado durante la estimulación ovárica.

Durante el análisis del posible impacto del protocolo de estimulación sobre la cinética de desarrollo embrionario, observamos que los embriones derivados de los ciclos estimulados con antagonistas de la GnRH e inducidos con agonistas de la GnRH, se dividen más rápidamente que los embriones procedentes de parejas tratadas con agonistas e inducidas con hCG (Tabla 1)

Estas variaciones, adquieren significación estadística en las primeras divisiones celulares (* $p \leq 0.05$). Sin embargo, un aspecto que resulta interesante, es que conforme avanzamos en el desarrollo embrionario, estas diferencias desaparecen (Figura 12).

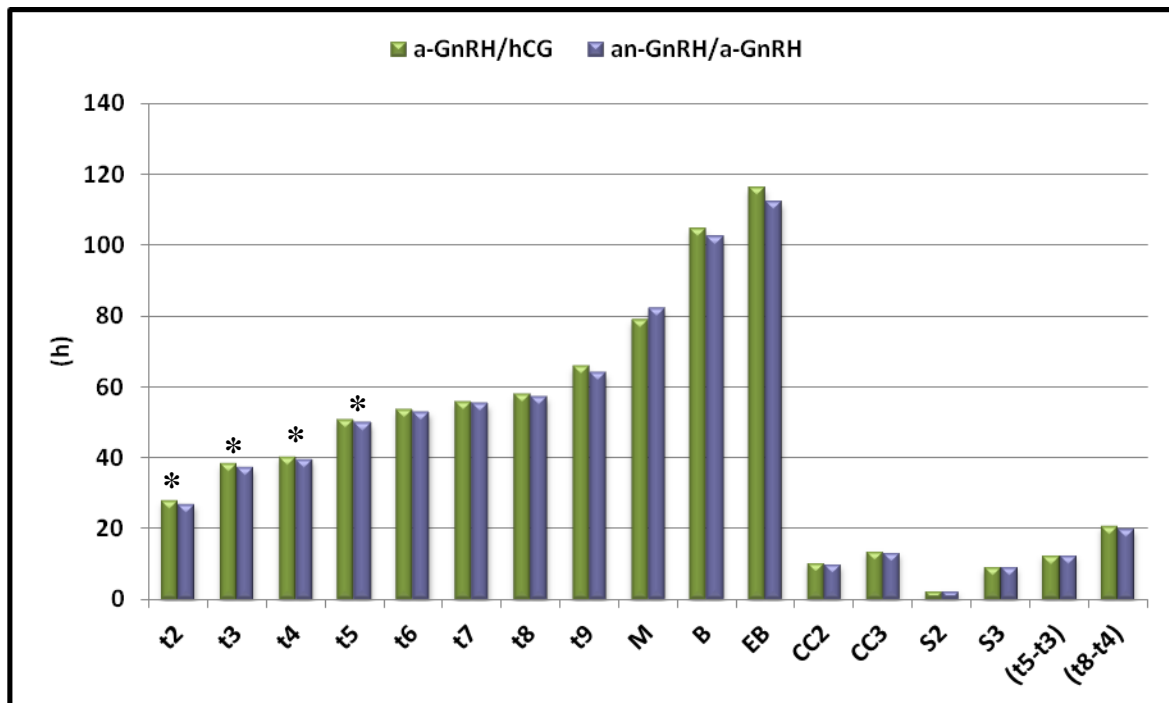


Figura 12. Cinética de desarrollo embrionario en función del protocolo de estimulación

	AGONISTAS- HCG	IC95%	ANTAGONISTAS- AGONISTAS	IC 95%	P
Embriones	n=716		n=2101		
T2 (h)	27.8	27.4-28.2	26.9	26.7-27.1	0.000
T3 (h)	38.2	37.7-38.7	37.1	36.8-37.4	0.000
T4 (h)	40.3	39.7-40.9	39.5	39.2-39.8	0.011
T5 (h)	50.7	50.1-51.3	49.8	49.4-50.2	0.027
T6 (h)	53.4	52.7-54.1	52.9	52.5-53.3	0.227
T7 (h)	55.7	54.9-56.5	55.2	54.8-55.6	0.282
T8 (h)	57.9	56.9-58.9	57.3	56.8-57.8	0.284
T9+ (h)	65.7	63.5-67.9	64.0	63.2-64.8	0.141
M (h)	78.8	75.5-82.1	82.1	79.9-84.3	0.145
B (h)	104.4	101.0-107.7	102.4	100.0-104.8	0.425
BE (h)	116.0	111.3-120.7	112.1	108.5-115.7	0.325
CC2 (h)	10.2	9.8-10.6	9.8	9.6-10.0	0.098
CC3 (h)	13.5	13.0-14.0	13.1	12.8-13.4	0.194
S2 (h)	2.1	1.7-2.5	2.3	2.1-2.5	0.227
S3 (h)	8.9	7.9-8.9	9.1	8.6-9.6	0.667
T4-T2 (h)	12.4	12.0-12.8	12.4	12.2-12.6	0.972
T8-T4 (h)	20.5	19.6-21.4	19.8	19.4-20.2	0.130

Tabla 1. Cinética de desarrollo embrionario en función del protocolo de estimulación

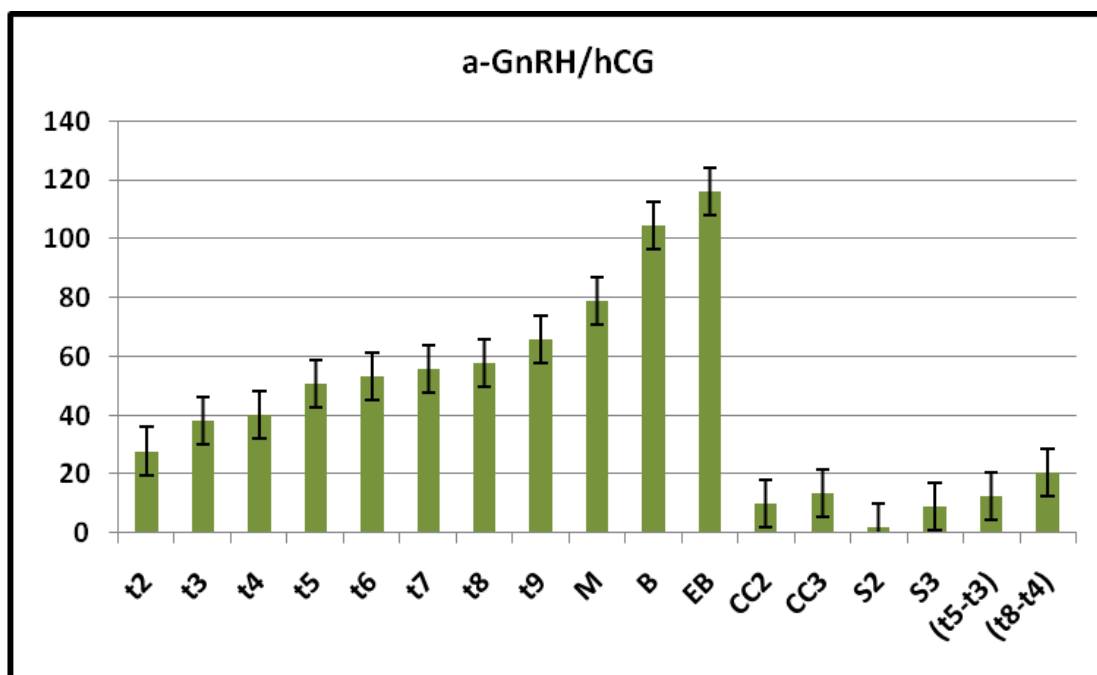


Figura 12a. Cinética de desarrollo embrionario para el protocolo a-GnRH/hCG

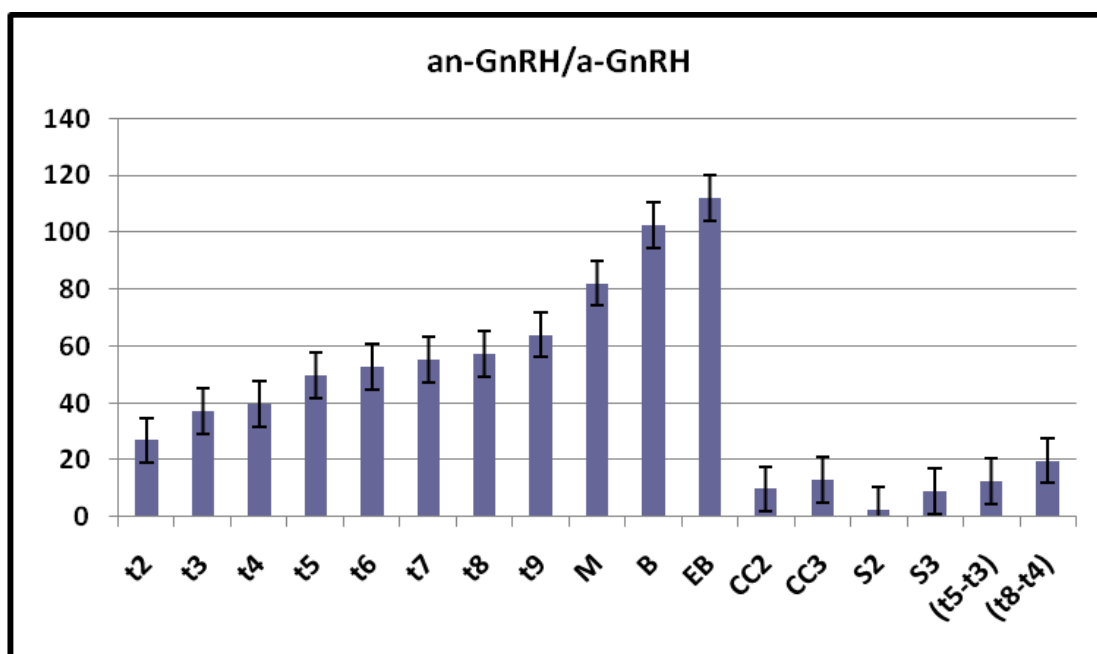


Figura 12b. Cinética de desarrollo embrionario para el protocolo an-GnRH/a-GnRH

1.2 Rangos óptimos de tiempo y porcentaje de embriones óptimos. Con el propósito de comprobar si el tipo de análogo de la GnRH y/o la forma en la que se desencadena la ovulación afectan a la proporción de embriones óptimos en estos intervalos de tiempo que predicen un mayor potencial de implantación, se calcula la fracción de embriones óptimos incluidos dentro del mismo para cada una de las variables con mayor fuerza predictiva (Figura 13). Aunque se describen resultados ligeramente mejores a favor del binomio antagonistas-agonistas no se observan diferencias significativas en el porcentaje de embriones de buena calidad, y por tanto con mayores probabilidades de implantación, entre los dos protocolos de estudio

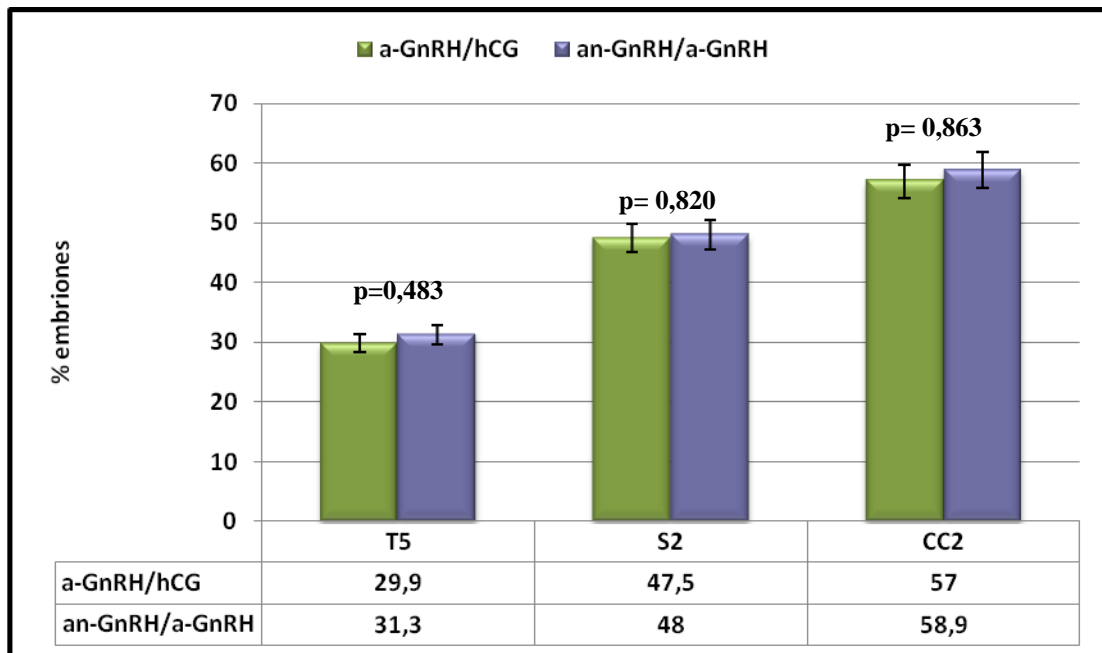


Figura 13. Proporción de embriones óptimos en función del protocolo de estimulación.

1.3 Distribución embrionaria y categorías morfocinéticas. Como se ha comentado previamente, las correlaciones entre parámetros morfocinéticos e implantación embrionaria forman la base de un sistema de clasificación jerárquico para la selección de embriones en el momento de la transferencia.

Relativo a la distribución embrionaria en cada una de las categorías del algoritmo, los resultados son muy similares a los anteriores. A pesar de que no se obtienen diferencias significativas, la cantidad de embriones en la clase E (criterios de exclusión)

es ligeramente menor en los protocolos con antagonistas-agonistas (Figura 14). En cuanto al resto de clases del algoritmo, se mantiene la tendencia positiva a favor de los antagonistas-agonistas en las mejores categorías (A y B), aunque de nuevo sin alcanzarse diferencias relevantes $p=0,421$ (Figura 15).

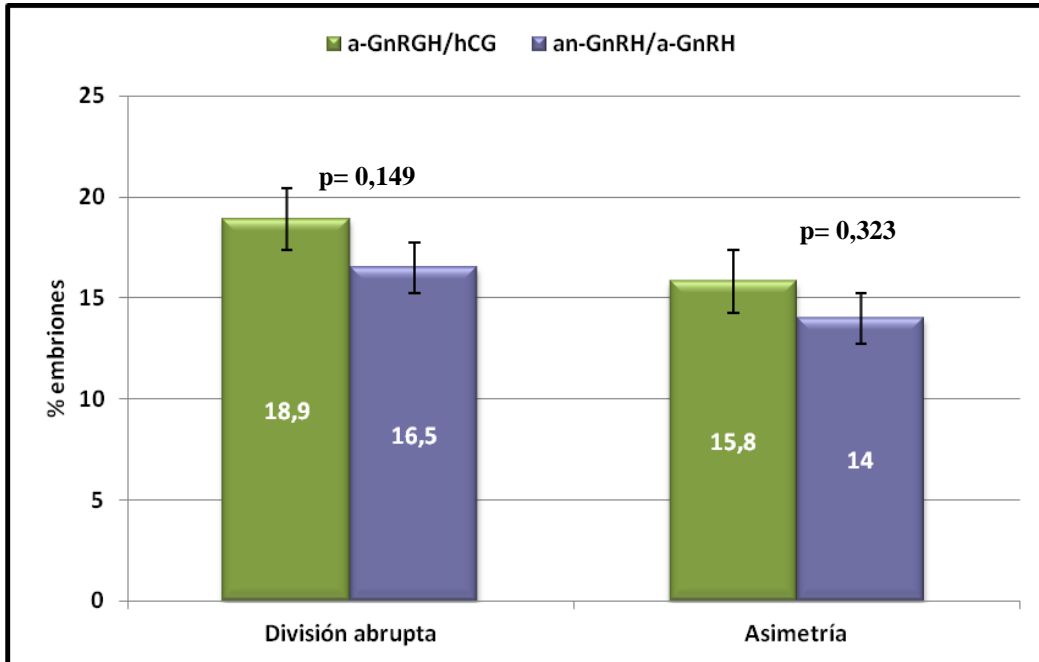


Figura 14. Porcentaje de embriones incluidos en los criterios de exclusión en función del protocolo de estimulación.

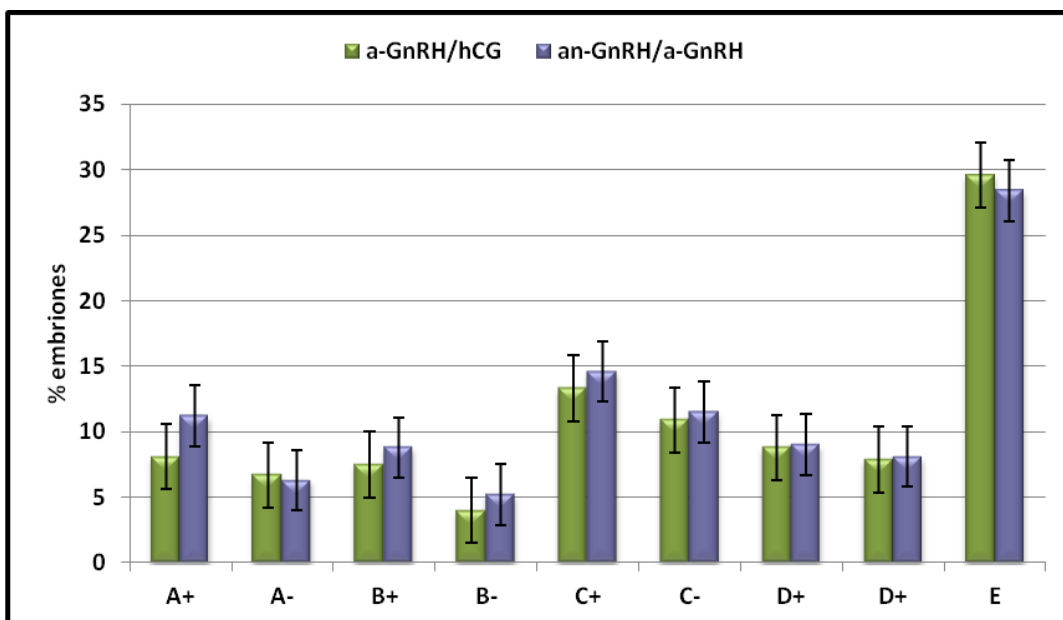


Figura 15. Distribución embrionaria en las categorías del algoritmo en función de los protocolos de estimulación (p=0.421)

1.4 Resultados reproductivos en función del protocolo de estimulación. En línea con los resultados anteriores, las tasas de gestación e implantación mejoran para embriones derivados de ciclos estimulados con antagonistas-agonistas, a pesar de no se encuentran diferencias significativas (Tabla 2).

	<i>agonistas-hCG</i> (n=103)	<i>Antagonistas-agonistas</i> (n=297)	<i>p</i>
<i>Tasa de gestación (%)</i>	47,6	58,6	0,339
<i>Tasa de implantación (%)</i>	28,7	36,6	0,084
<i>Tasa de aborto (%)</i>	11,7	14,1	0,524

Tabla 2. Resultados reproductivos en función del protocolo de estimulación

2. Efecto del tipo de gonadotropina sobre la cinética de desarrollo embrionario.

2.1 Cinética de desarrollo embrionario en función del tipo de gonadotropina.

Las medias de tiempo de todas las divisiones embrionarias (de T2 a T9) junto con las variables que definen los intervalos entre ciclos celulares se presentan numéricamente en la Tabla 3 y gráficamente en la Figura 16. Los resultados no revelan la existencia de diferencias significativas entre los embriones derivados de ciclos estimulados con FSH recombinante, HMG o la combinación FSH+HMG.

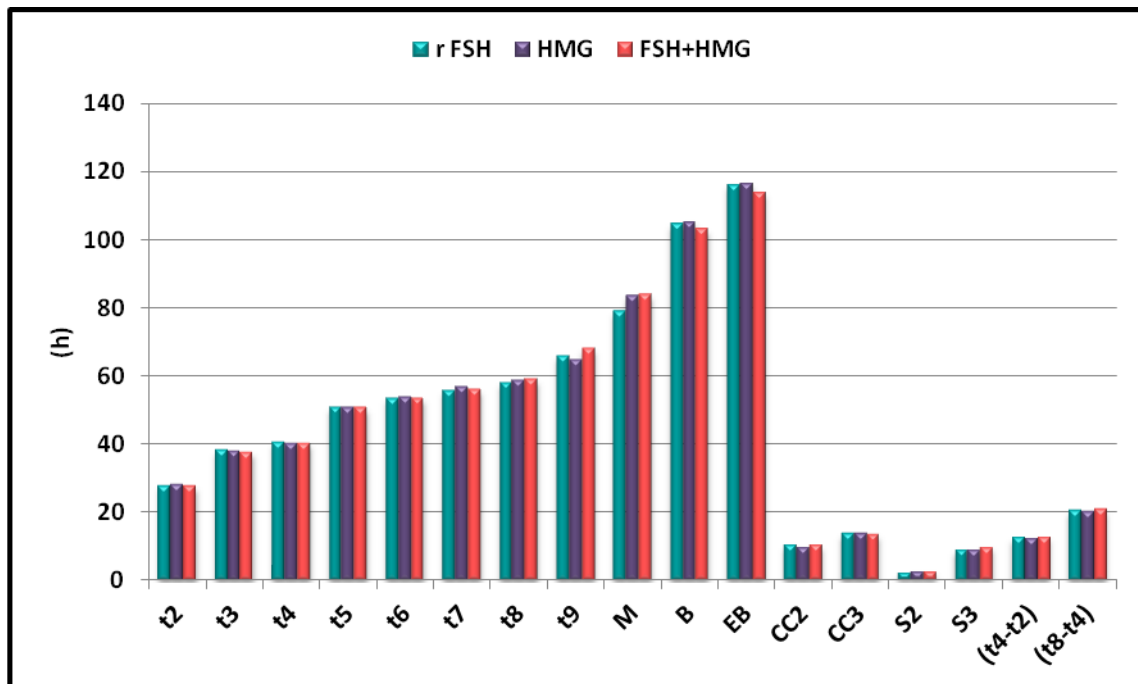


Figura 16. Cinética de desarrollo en función del tipo de gonadotropina

	FSH	IC 95%	HMG	IC 95%	FSH+HMG	IC 95%	P
Embriones	n=710		n=646		n=776		
T2 (h)	27.8	27.4-28.2	27.9	27.5-28.3	27.5	27.1-27.9	0.354
T3 (h)	38.2	37.7-38.7	37.8	37.2-38.4	37.6	37.1-38.1	0.302
T4 (h)	40.3	39.7-40.9	40.1	39.6-40.6	40.2	39.6-40.8	0.557
T5 (h)	50.7	50.1-51.3	50.8	50.0-51.6	50.5	49.9-51.1	0.866
T6 (h)	53.4	52.7-54.1	53.8	53.0-54.6	53.4	52.7-54.1	0.837
T7 (h)	55.7	54.9-56.5	56.5	55.5-57.5	55.9	55.2-56.6	0.525
T8 (h)	57.9	56.9-58.9	58.4	57.3-59.5	58.9	58.0-59.7	0.205
T9+ (h)	65.7	63.5-67.9	64.7	61.7-67.7	68.0	66.1-69.9	0.057
M (h)	78.8	75.5-82.1	83.4	79.6-87.2	83.8	81.1-86.5	0.073
B (h)	104.4	101.0-107.8	105.1	101.5-108.7	102.9	100.4-105.4	0.525
BE (h)	116.0	111.3-120.7	116.3	112.5-120.1	113.7	111.1-116.3	0.456
CC2 (h)	10.2	9.8-10.6	9.7	9.3-10.1	10.1	9.7-10.5	0.333
CC3 (h)	13.5	13.0-14.0	13.6	13.0-14.2	13.4	12.9-13.9	0.799
S2 (h)	2.1	1.7-2.5	2.3	2.0-2.6	2.4	2.0-2.8	0.499
S3 (h)	8.9	7.9-9.9	8.8	7.7-9.9	9.7	8.8-10.6	0.451
T4-T2 (h)	12.4	12.0-12.8	12.3	11.9-12.7	12.7	12.3-13.1	0.432
T8-T4 (h)	20.5	19.6-21.4	20.0	19.0-21.0	20.7	20.0-21.4	0.264

Tabla 3. Cinética de desarrollo embrionario en función del tipo de gonadotropina

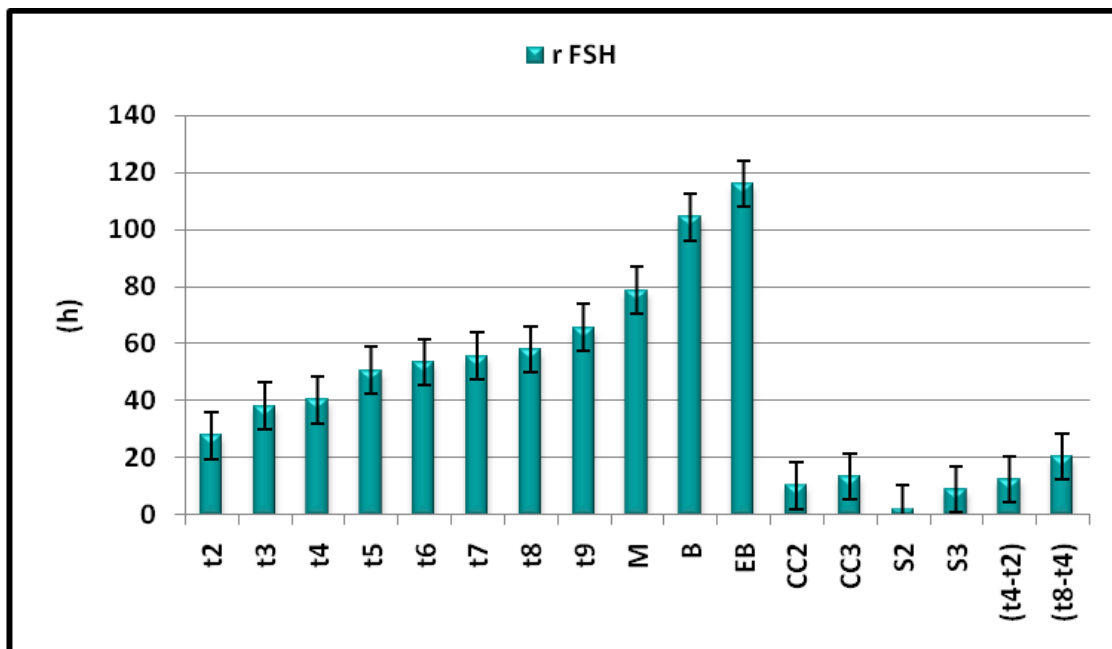


Figura 16a. Cinética de desarrollo embrionario para la FSH recombinante

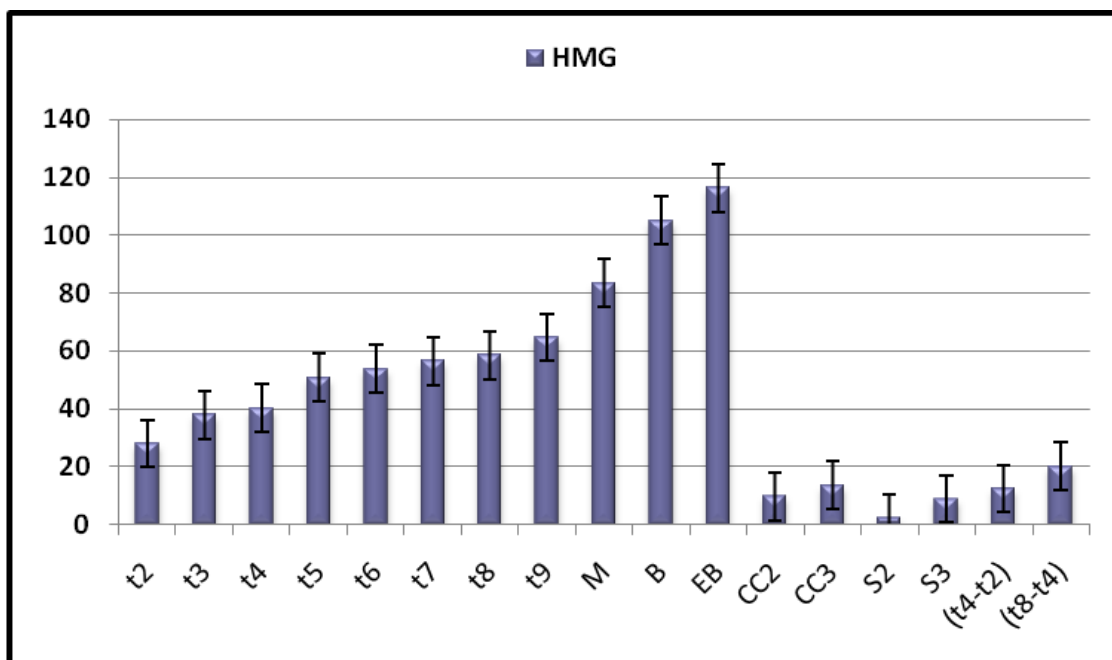


Figura 16b. Cinética de desarrollo embrionario para la HMG

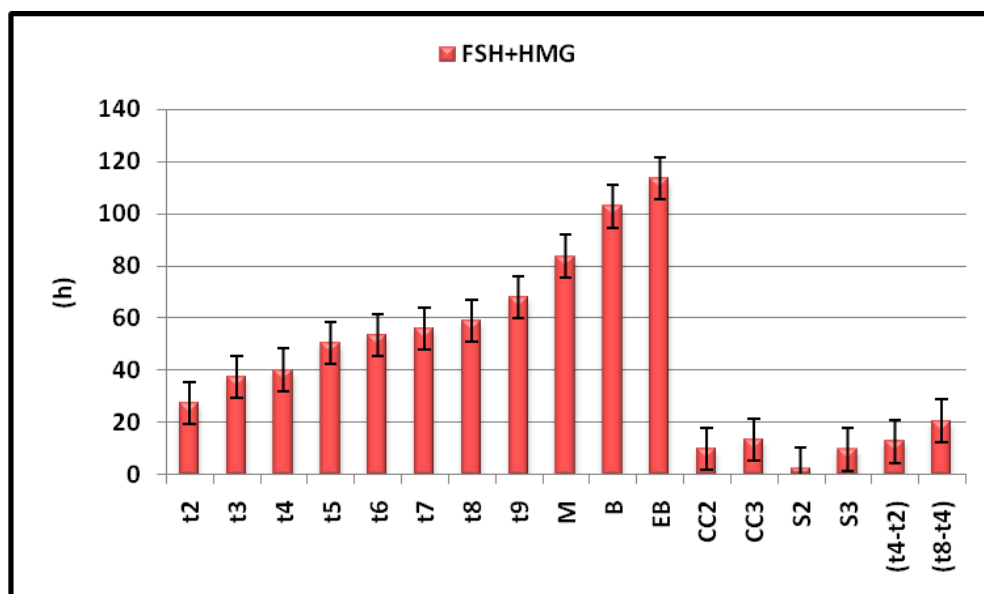


Figura 16c. Cinética de desarrollo embrionario para la la combinación r FSH+HMG

2.2 Rangos de tiempo y porcentaje de embriones óptimos. El análisis de la calidad embrionaria, y en consecuencia de la cantidad de embriones con mayores posibilidades de implantación, no sugiere la existencia de un preparado gonadotrópico que mejore claramente la calidad embrionaria en ninguna de las variables analizadas (Figura 17), aunque sí se detecta un leve incremento de la competencia embrionaria en los ciclos estimulados únicamente con FSH recombinante.

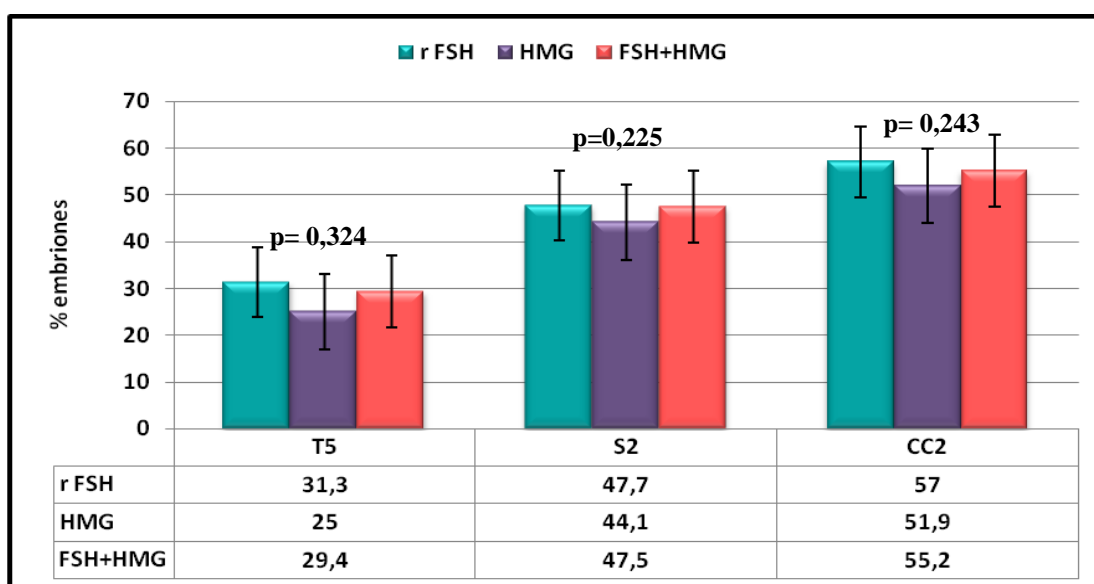


Figura 17. Porcentaje de embriones óptimos en función del tipo de gonadotropinas

2.3 Distribución embrionaria y categorías morfocinéticas. La cantidad de embriones presentes en la categoría que incluye a los criterios de exclusión (clase E) es menor para los ciclos estimulados sólo con FSH recombinante (Figura 18) aunque, de nuevo, no se detectan variaciones relevantes.

En cuanto al resto de categorías consideradas, los datos obtenidos continúan con la misma línea argumental expuesta hasta ahora; independientemente del tipo de gonadotropina empleado en los procesos de estimulación ovárica controlada, las características morfocinéticas de los correspondientes embriones no varían de forma significativa de un tratamiento a otro $p=0,231$ (Figura 19).

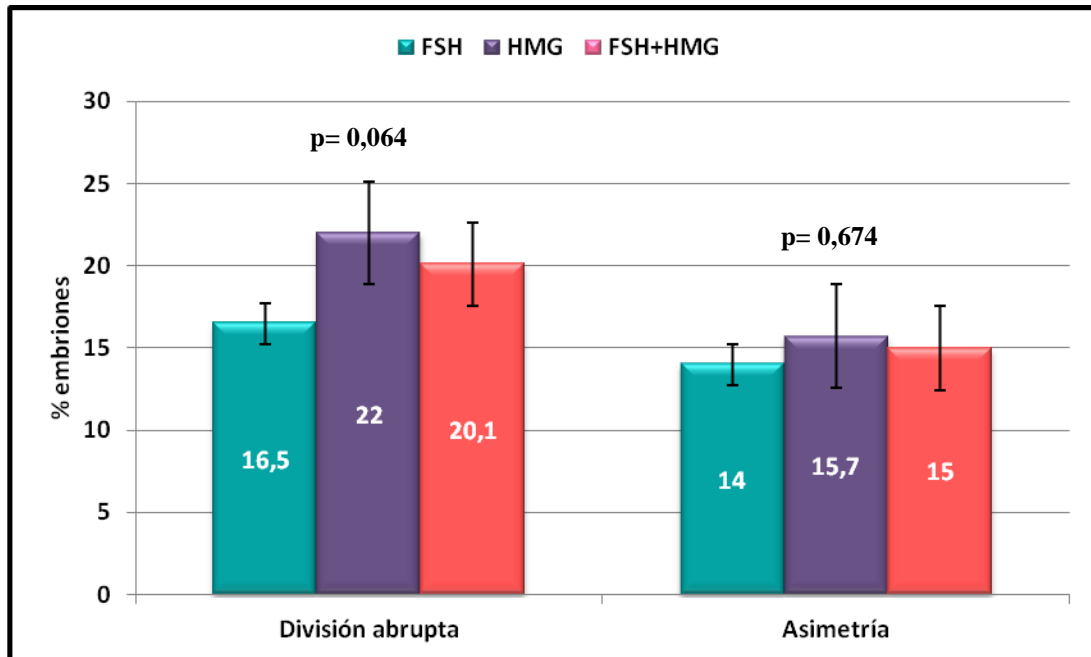


Figura 18. Fracción de embriones incluidos en los criterios de exclusión en función del tipo de gonadotropinas

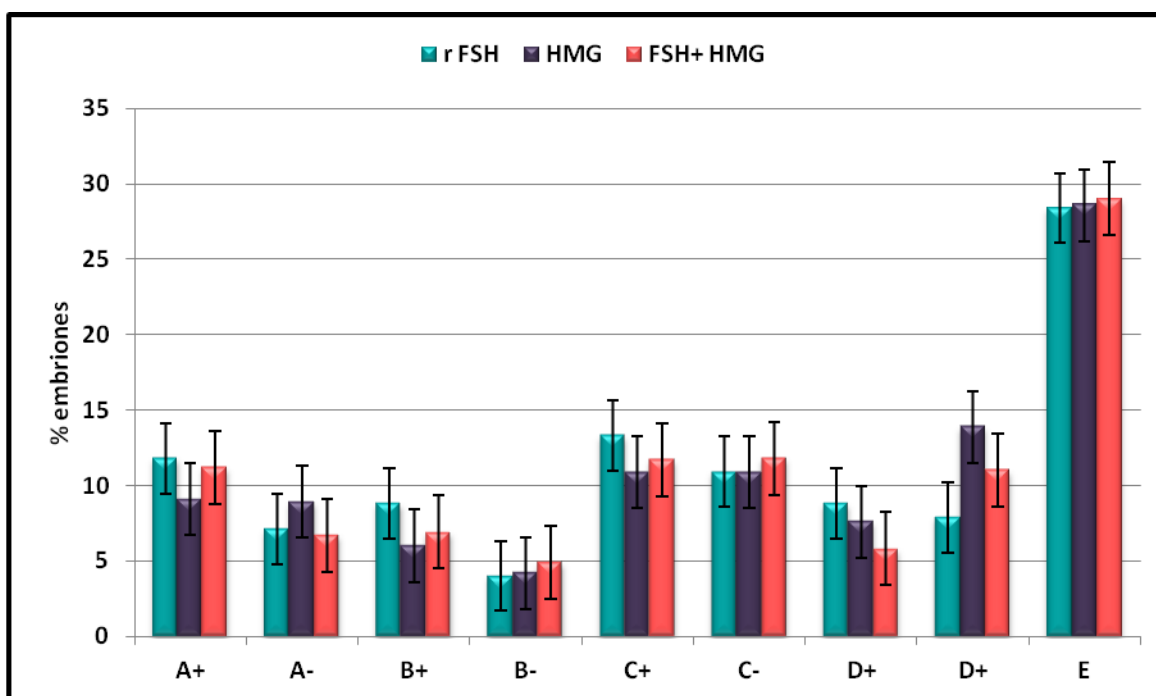


Figura 19. Distribución embrionaria en las categorías del algoritmo en función del tipo de gonadotropinas (p=0.231)

2.4 Resultados reproductivos en función del tipo de gonadotropina. No se observan diferencias significativas entre los tres tratamientos ni para las tasas de gestación, ni para las tasas de implantación; sin embargo, en este caso, la tendencia se invierte y se alcanzan mejores resultados en los ciclos estimulados con HMG con respecto al resto de tratamientos (Tabla 4).

	<i>r FSH (n=103)</i>	<i>HMG (n=96)</i>	<i>FSH+HMG (n=111)</i>	<i>p</i>
<i>Tasa de gestación (%)</i>	47,6	58,6	58,3	0,349
<i>Tasa de implantación (%)</i>	28,7	38,6	35,3	0,329
<i>Tasa de aborto (%)</i>	11,7	15,6	7,1	0,054

Tabla 4. Resultados reproductivos en función del tipo de gonadotropinas

3.-Influencia de la dosis de gonadotropinas y de la concentración de hormonas esteroideas sobre el desarrollo embrionario.

3.1.- Dosis de gonadotropinas

3.1.1 Efecto de la dosis de gonadotropinas sobre la cinética de desarrollo embrionario. Se describe un intervalo óptimo de dosis de gonadotropinas (FSH recombinante), en el que los embriones se caracterizan por iniciar antes las sucesivas divisiones celulares (Tabla 5); resulta interesante destacar el hecho de que estas cantidades adecuadas de FSH comprenden el intervalo que incluye la menor cantidad de dosis empleada para la estimulación ovárica. Estas diferencias alcanzan significación estadística (* $p \leq 0.05$) en la práctica totalidad de las variables de tiempo analizadas (Figura 20).

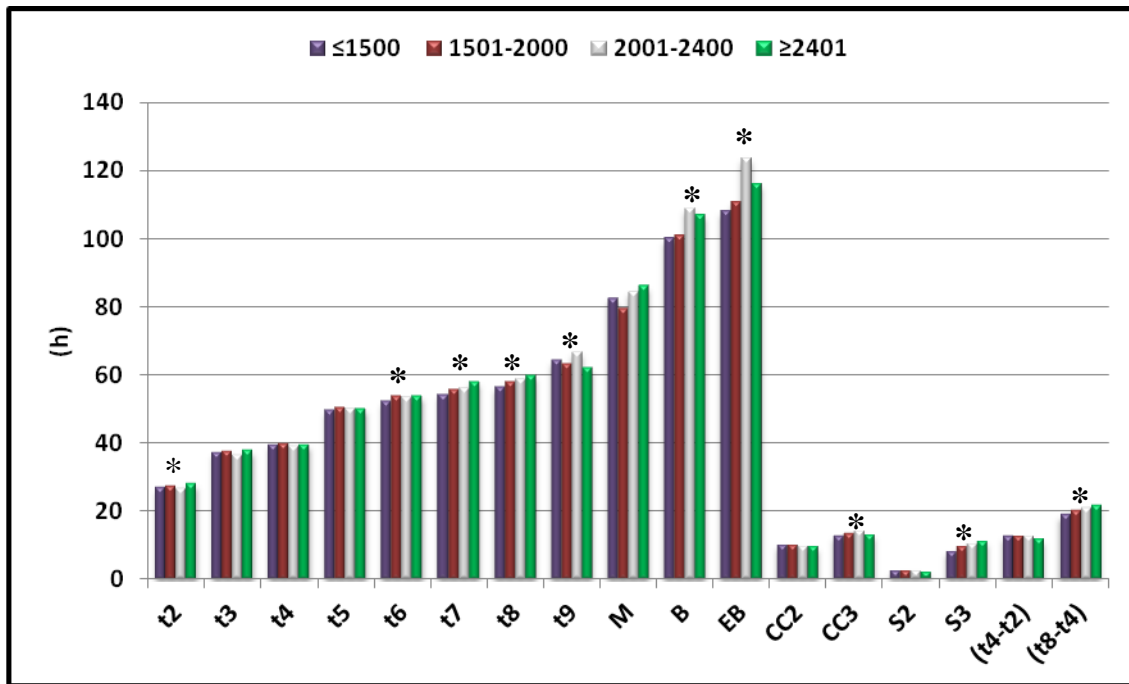


Figura 20. Efecto de la dosis de gonadotropinas sobre la cinética de desarrollo embrionario

	<1500	IC 95%	1501-2000	IC 95%	2001-2400	IC 95%	>2401	IC 95%	P
Embriones	n=840		n=698		n=355		n=151		
T2 (h)	26.7 ^a	26.4-27.0	27.1	26.7-27.5	26.6	26.1-27.1	27.9 ^b	27.2-28.6	0.039
T3 (h)	37.1	36.6-37.6	37.4	36.9-37.9	36.3	35.7-36.9	37.7	36.7-38.7	0.059
T4 (h)	39.5	39.0-40.0	39.7	38.2-40.2	39.1	38.4-39.8	39.5	38.5-40.5	0.608
T5 (h)	49.4	48.8-50.0	50.3	49.6-51.0	49.9	48.9-50.9	50.0	48.3-51.7	0.274
T6 (h)	52.0 ^a	51.5-52.5	53.5 ^b	52.9-54.1	53.4 ^b	52.5-54.3	53.8	52.0-55.6	0.002
T7 (h)	54.2 ^a	53.6-54.8	55.6 ^b	54.9-56.3	56.0 ^b	55.0-57.0	57.9 ^b	55.6-60.2	0.000
T8 (h)	56.3 ^a	55.6-57.0	57.7	56.9-58.5	58.4 ^b	57.3-59.5	59.7 ^b	57.1-62.3	0.000
T9+ (h)	61.9 ^a	59.2-64.6	62.9	61.3-64.5	66.6 ^b	64.6-68.6	64.1	62.9-65.3	0.031
M (h)	82.4	79.5-85.3	79.1	74.5-83.7	84.3	79.6-89.0	85.9	75.9-95.9	0.285
B (h)	99.9 ^a	96.6-103.2	100.8	94.2-107.4	108.7 ^b	104.3-113.1	106.9	101.1-112.7	0.026
BE (h)	107.9 ^a	104.5-111.3	110.4	100.3-120.5	123.5 ^b	118.1-128.9	116.0	106.0-126.0	0.007
CC2 (h)	10.0	9.6-10.4	10.0	9.6-10.4	9.6	9.1-10.1	9.5	8.6-10.4	0.381
CC3 (h)	12.7 ^a	12.3-13.1	13.4	12.8-14.0	13.9 ^b	13.2-14.6	13.0	11.7-14.3	0.023
S2 (h)	2.2	1.9-2.5	2.4	2.0-2.8	2.5	2.1-2.9	1.9	1.2-2.6	0.442
S3 (h)	8.2 ^a	7.6-8.8	9.4	8.5-10.3	10.3 ^b	9.1-11.5	11.1 ^b	8.9-13.3	0.001
T4-T2 (h)	12.5	12.1-12.9	12.6	12.2-13.0	12.5	12.0-13.0	11.6	10.8-12.4	0.188
T8-T4 (h)	18.8 ^a	18.2-19.4	20.2 ^b	19.5-20.9	21.0 ^b	20.0-22.0	21.6 ^b	19.6-23.3	0.000

Tabla 5. Cinética de desarrollo embrionario en función de las dosis de gonadotropinas (FSH recombinante); a,b p≤0.05

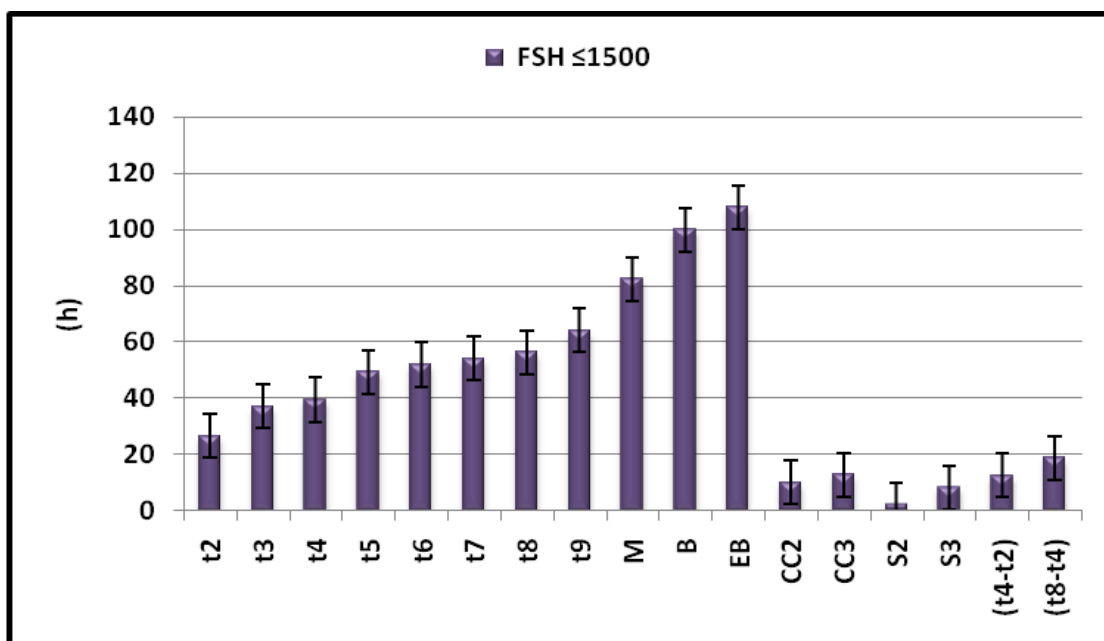


Figura 20a. Efecto de la dosis de gonadotropinas (FSH ≤ 1500) sobre la cinética de desarrollo embrionario

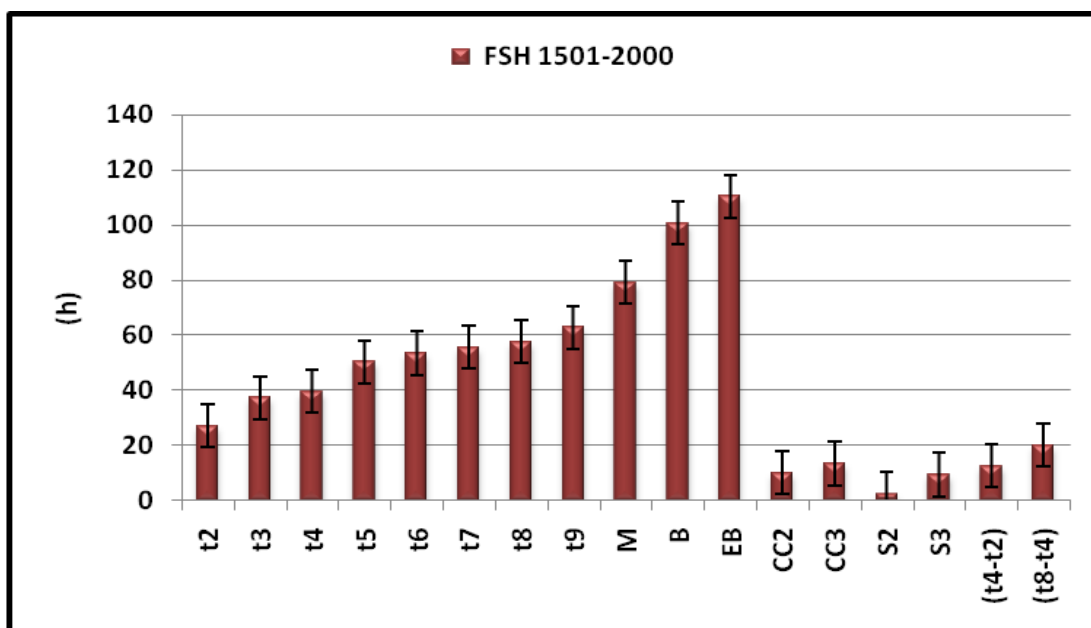


Figura 20b. Efecto de la dosis de gonadotropinas (FSH 1501-2000) sobre la cinética de desarrollo embrionario

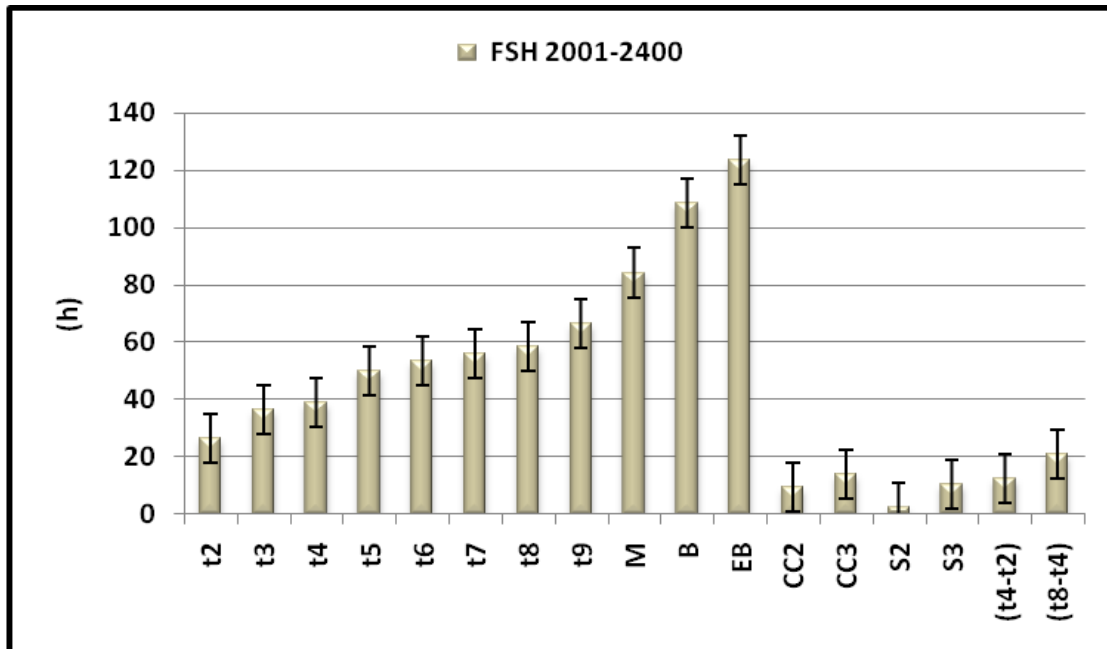


Figura 20c. Efecto de la dosis de gonadotropinas (FSH 2001-2400) sobre la cinética de desarrollo embrionario

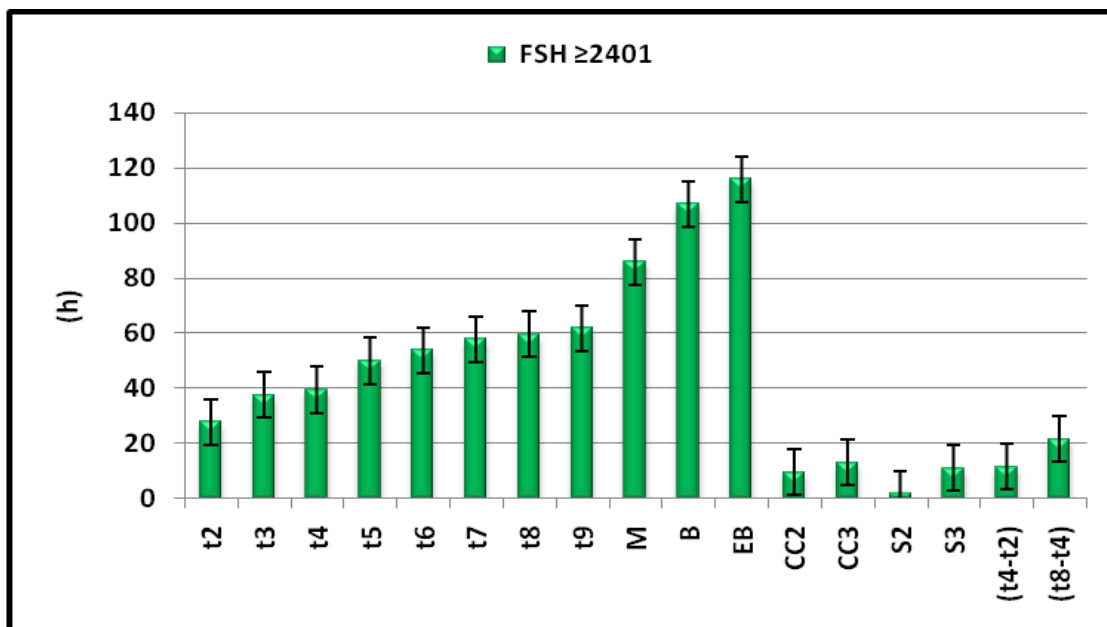


Figura 20d. Efecto de la dosis de gonadotropinas (FSH ≥2401) sobre la cinética de desarrollo embrionario

3.1.2 Rangos de tiempo y porcentaje de embriones óptimos. Al igual que con el tipo de gonadotropinas, se examinan la cantidad de embriones óptimos en cada una de las

variables que predicen el potencial de implantación y, aunque se han descrito diferencias significativas para las sucesivas divisiones embrionarias, se encuentra que la dosis de FSH recombinante no afecta a esta proporción; no obstante, se refiere una tendencia a favor del intervalo que incluye las dosis mínimas de gonadotropinas en todas las variables analizadas, en la misma línea que los datos cinéticos (Figura 21)

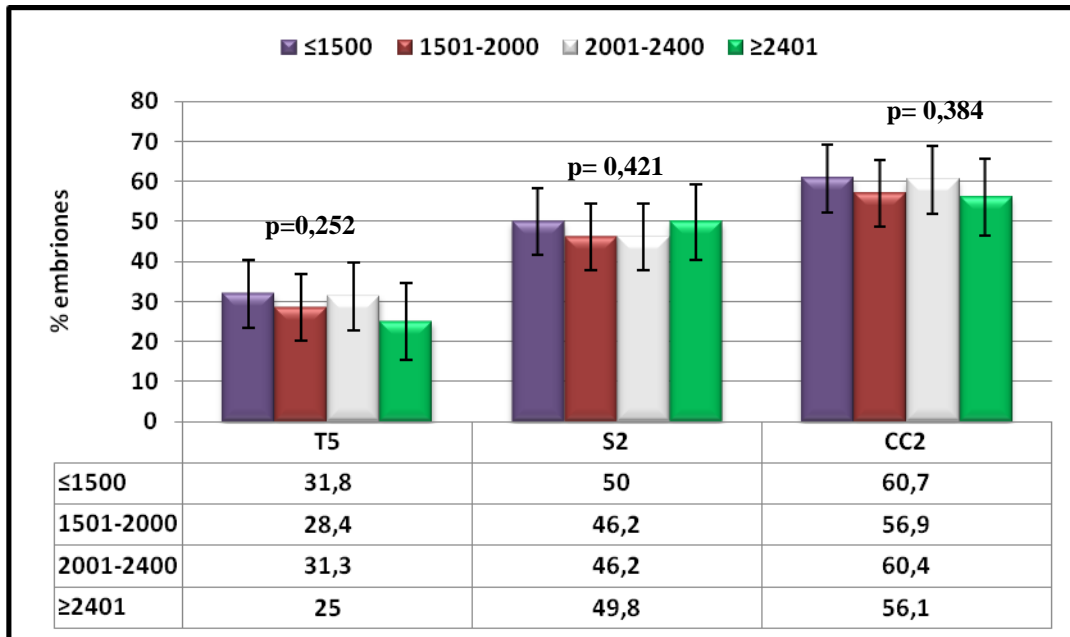


Figura 21. Proporción de embriones óptimos en función de la dosis de gonadotropinas.

3.1.3. Distribución embrionaria y categorías morfocinéticas. Cuando se evalúa la influencia de la dosis de gonadotropinas administradas sobre las características morfocinéticas que definen cada una de las categorías del algoritmo no se encuentran diferencias significativas; estos resultados indican que el efecto descrito sobre la velocidad de desarrollo embrionario no se traduce en un aumento real de las probabilidades de implantación $p=0.704$ (Figura 22).

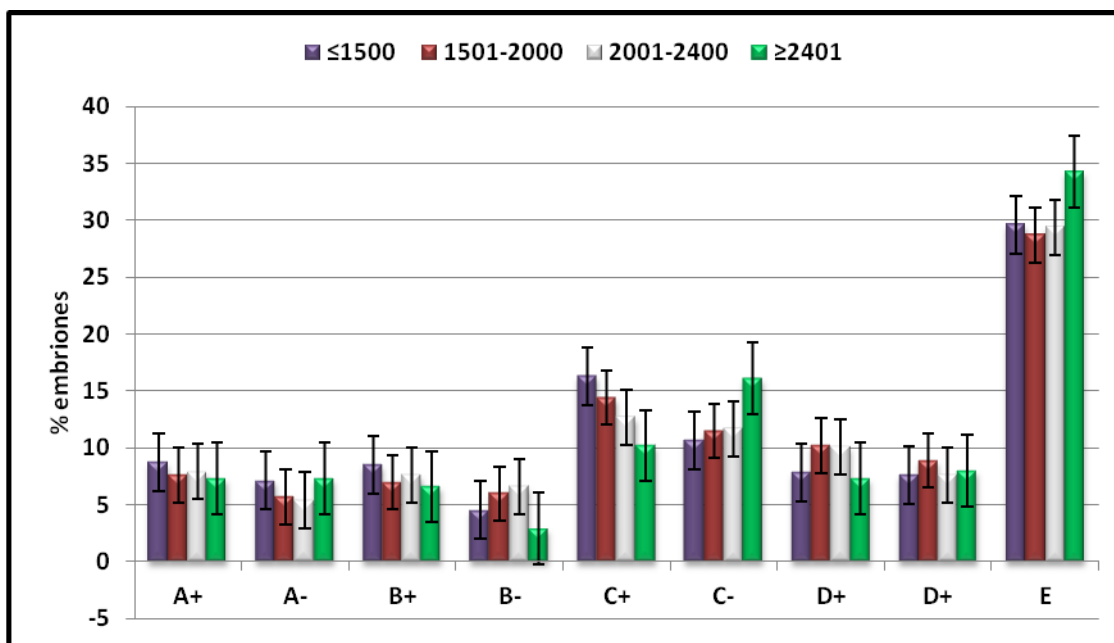


Figura 22. Distribución embrionaria en las categorías del algoritmo en función de las dosis de gonadotropinas administradas (p=0.704)

3.1.4. Resultados reproductivos en función de las dosis de gonadotropinas. De nuevo no se obtienen diferencias estadísticas desde el punto de vista de los resultados reproductivos, por lo que se puede asumir que las dosis de gonadotropinas afectan a la velocidad de desarrollo embrionario pero que estas diferencias no se traducen en un incremento real de las probabilidades de lograr una gestación (Tabla 6)

	≤1500	1501-2000	2001-2400	≥2401	p
	n=105	n=98	n=47	n=47	
Tasa de gestación (%)	60	59,8	57,7	57,5	0,984
Tasa de implantación (%)	34,1	34,6	31,1	36,1	0,266
Tasa de aborto (%)	14,2	14	13,5	16	0,993

Tabla 6. Resultados reproductivos en función de la dosis de gonadotropinas

3.2 Concentraciones de estradiol el día de la inducción de la ovulación.

3.2.1. Efecto de las concentraciones de estradiol sobre la cinética de desarrollo embrionario. De acuerdo a los niveles de esteroides, y en particular a la concentración de estradiol el día en el que se induce la ovulación con el agonista de la GnRH, se observa una relación inversamente proporcional entre los niveles de estradiol y la cinética de desarrollo embrionario (Tabla 7). Se encuentran diferencias significativas (* $p \leq 0.05$) en prácticamente todas las variables examinadas (Figura 23)

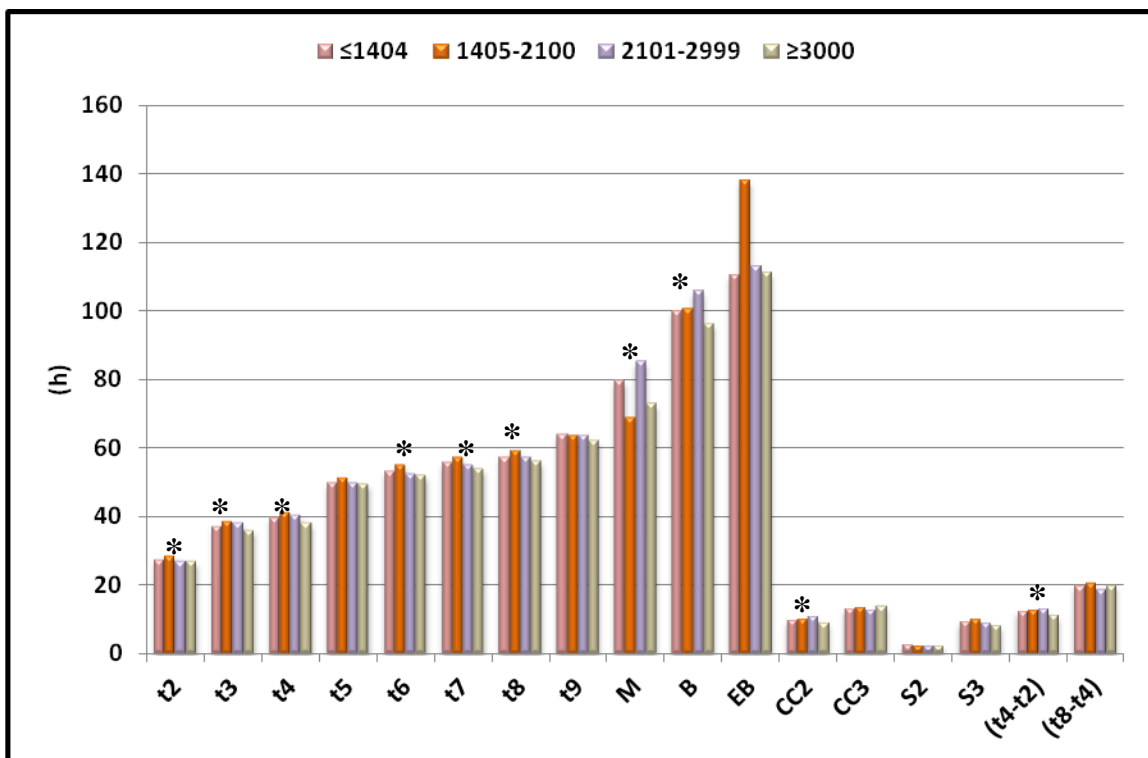


Figura 23. Efecto de las concentraciones de estradiol sérico sobre la cinética de desarrollo embrionario

	<1404	IC 95%	1405-2100	IC 95%	2101-2999	IC 95%	>3000	IC 95%	P
Embriones	n=858		n=470		n=408		n=263		
T2 (h)	27.3	26.7-27.9	28.4^b	27.7-29.1	27.0	26.4-27.6	26.8^a	26.0-27.6	0.008
T3 (h)	37.1	36.5-37.7	38.5^b	37.8-39.2	37.9^b	37.0-38.8	35.9^a	34.8-37.0	0.001
T4 (h)	39.6^b	39.0-40.2	40.9^b	40.0-41.8	40.2^b	39.3-41.1	38.0^a	37.0-39.0	0.000
T5 (h)	49.7	48.9-50.5	51.1	49.9-52.3	49.7	48.7-50.7	49.4	47.9-50.9	0.170
T6 (h)	53.1	52.3-53.9	55.0^b	53.9-56.1	52.3	51.3-53.3	51.9^a	50.5-53.3	0.001
T7 (h)	55.6	54.8-56.4	57.1^b	56.1-58.1	54.9	53.8-56.0	53.9^a	52.3-55.5	0.002
T8 (h)	57.3	56.3-58.3	59.0^b	57.9-60.1	57.1	55.8-58.4	56.0^a	54.3-57.7	0.021
T9+ (h)	64.0	62.4-65.6	63.3	61.8-64.8	63.3	61.2-65.4	62.1	59.9-64.3	0.601
M (h)	79.4^c	73.8-85.0	68.9^{b,c}	65.4-72.4	85.0^{a,b}	78.9-91.1	72.8^a	68.3-77.3	0.002
B (h)	99.8	90.2-109.4	100.5	90.0-111.0	105.7^b	102.5-108.9	96.2^a	91.2-101.2	0.004
BE (h)	110.3	99.0-121.3	138.0	123.0-153.0	113.0	108.0-118.0	111.0	101.3-120.7	0.333
CC2 (h)	9.6	9.1-10.1	9.9	9.2-10.6	10.6^b	9.9-11.3	8.9^a	8.0-9.8	0.015
CC3 (h)	13.0	12.4-13.6	13.2	12.2-14.2	12.6	11.7-13.5	13.7	12.6-14.8	0.459
S2 (h)	2.5	2.0-3.0	2.3	1.8-2.8	2.1	1.6-2.6	2.0	1.3-2.7	0.560
S3 (h)	9.1	8.1-10.1	9.9	8.4-11.4	8.9	7.5-10.4	8.0	6.4-9.6	0.382
T4-T2 (h)	12.3^b	11.8-12.8	12.6^b	11.9-13.3	12.9^b	12.3-13.5	11.0^a	10.2-11.8	0.008
T8-T4 (h)	19.8	19.0-20.7	20.6	19.4-21.8	18.7	17.4-20.0	19.9	18.4-21.4	0.150

Tabla 7. Cinética de desarrollo embrionario en función de las concentraciones de estradiol; a,b,c p≤0.05

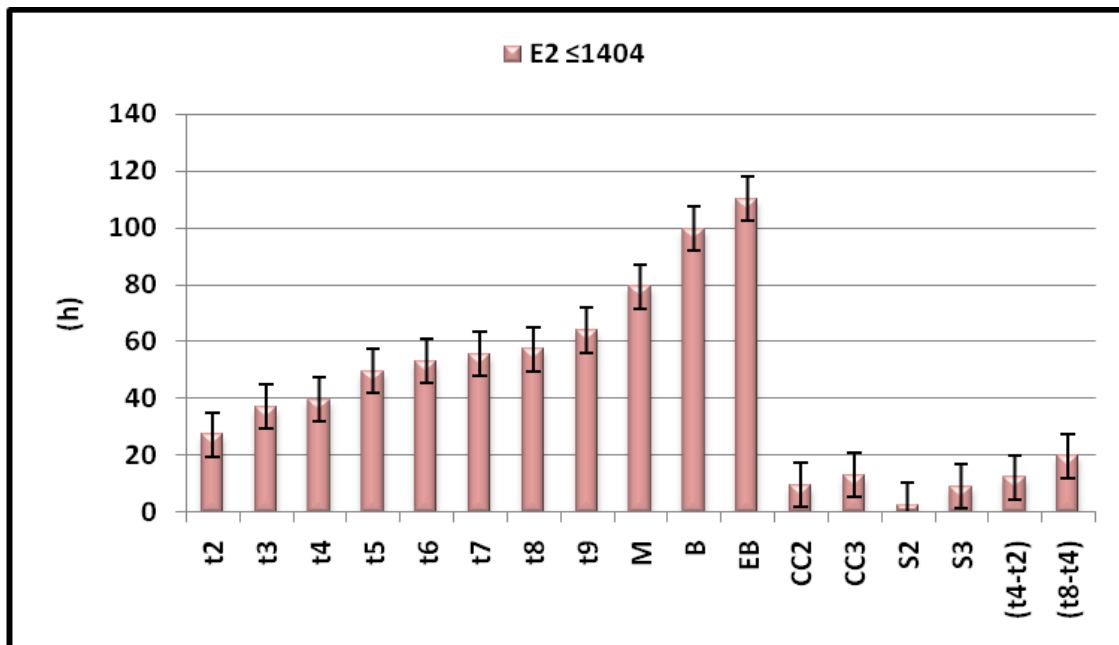


Figura 23a. Efecto de las concentraciones de estradiol sérico ($E2 \leq 1404$) sobre la cinética de desarrollo embrionario

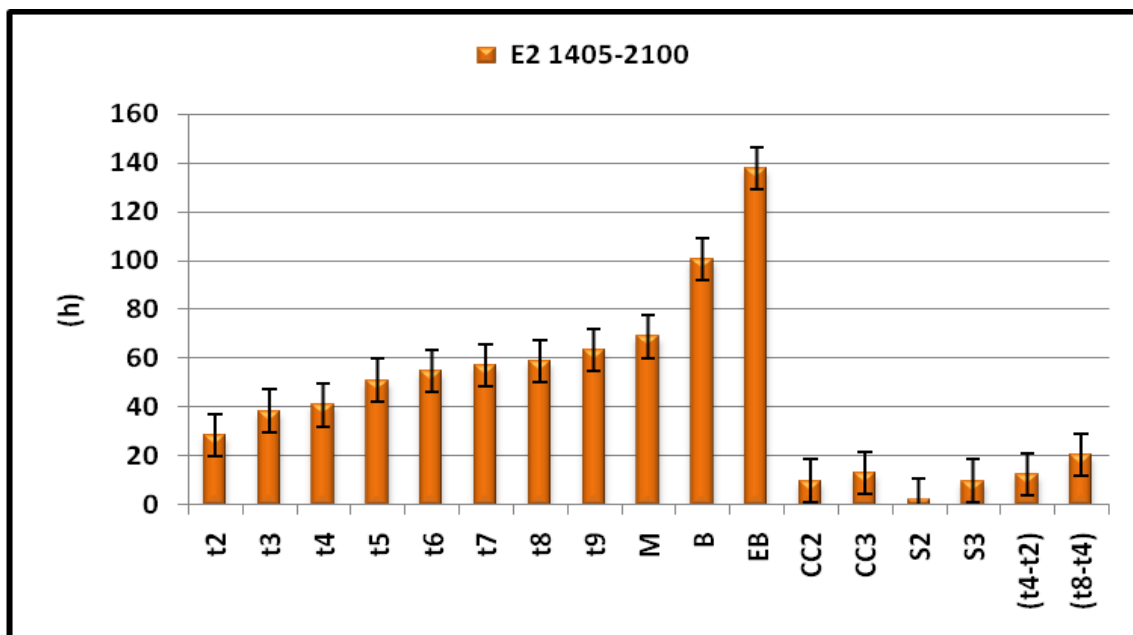


Figura 23b. Efecto de las concentraciones de estradiol sérico ($E2 1405-2100$) sobre la cinética de desarrollo embrionario

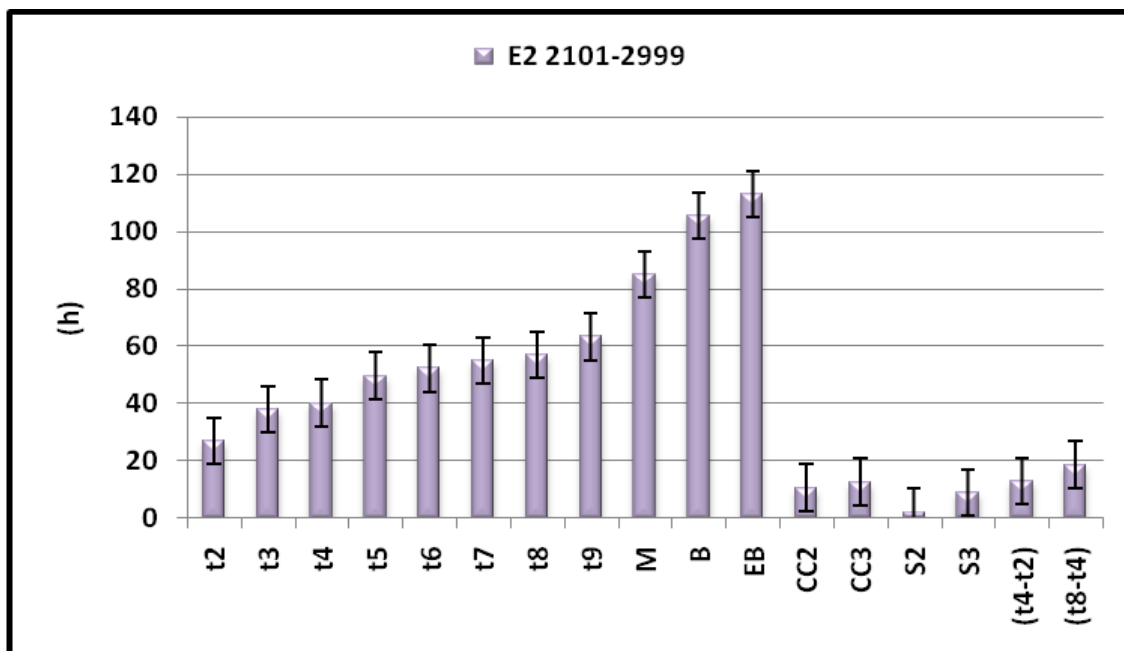


Figura 23c. Efecto de las concentraciones de estradiol sérico (E2 2101-2999) sobre la cinética de desarrollo embrionario

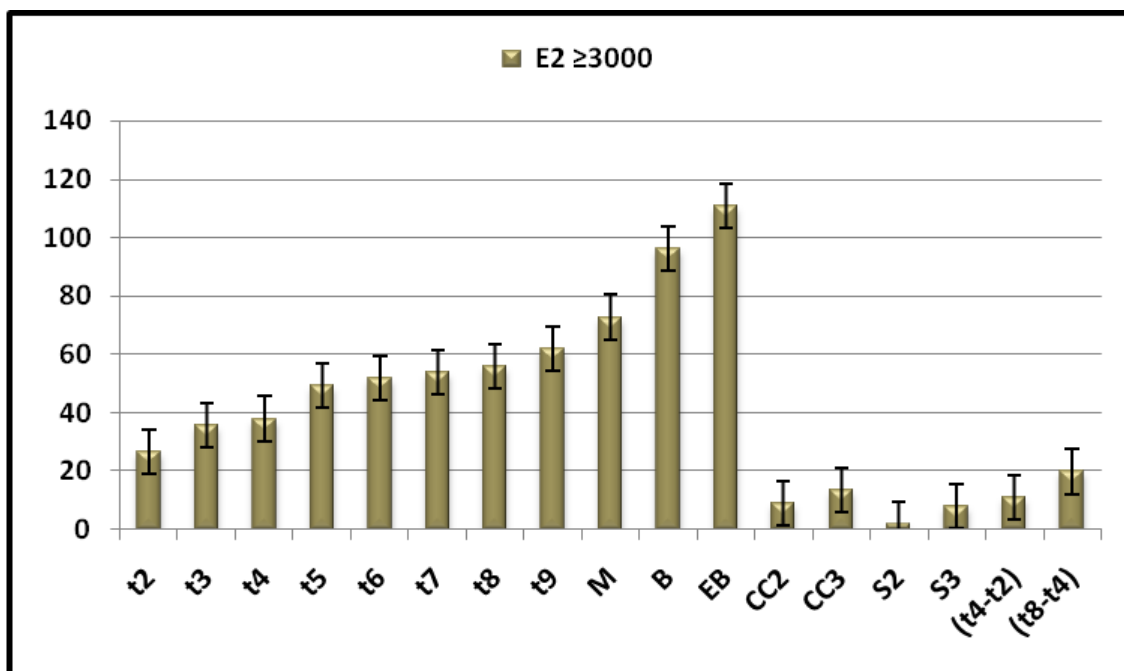


Figura 23D. Efecto de las concentraciones de estradiol sérico (E2 ≥3000) sobre la cinética de desarrollo embrionario

3.2.2 Rangos de tiempo y porcentaje de embriones óptimos. En este caso, las diferencias significativas observadas en la cronología de los ciclos se continúan en los

intervalos óptimos de tiempo que predicen un mayor potencial de implantación. Se muestran diferencias significativas tanto en T5 como en CC2; los embriones óptimos son significativamente más abundantes en las mismas concentraciones de estradiol que implican un buen comportamiento cinético (Figura 24).

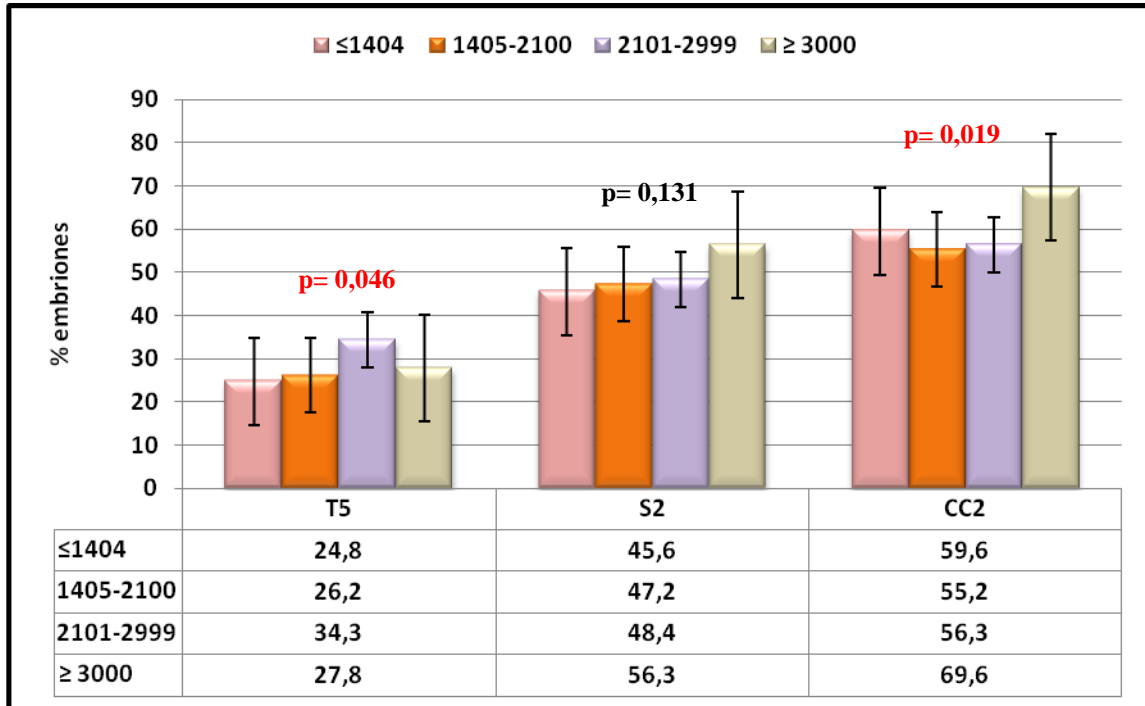


Figura 24. Porcentaje de embriones óptimos en función de las concentraciones séricas de estradiol

3.2.3 Distribución embrionaria y categorías morfocinéticas. En cuanto a la distribución embrionaria en las distintas categorías del algoritmo, los resultados coinciden con las tendencias anteriores de modo que se confirma la adecuada cinética de desarrollo embrionario para estos niveles esteroideos $p=0.057$ (Figura 25).

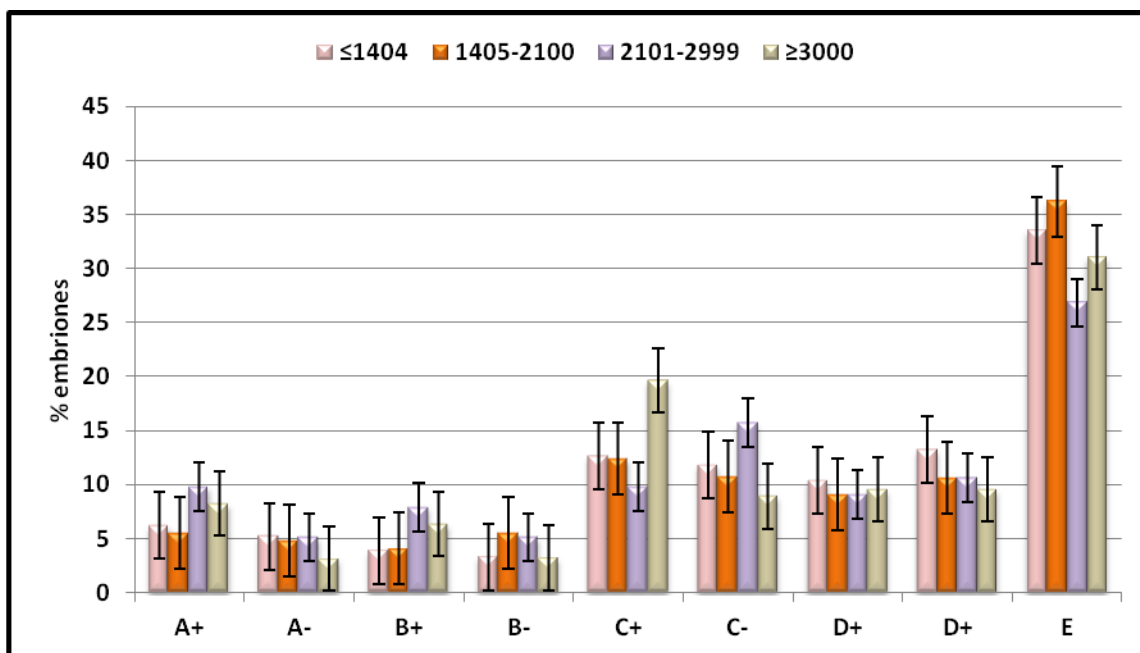


Figura 25. Distribución embrionaria en las categorías del algoritmo en función de las concentraciones séricas de estradiol (p=0.057)

3.2.4. Resultados reproductivos en función de las concentraciones séricas de estradiol. Las concentraciones séricas de estradiol el día en el que se induce la ovulación no influyen sobre las tasas de gestación; no se observan diferencias significativas en los resultados gestacionales en función de los valores de este esteroide a pesar de las importantes variaciones descritas en cinética y en la proporción de embriones con mayores posibilidades de implantación (Tabla 8).

	≤1404	1405-2100	2101-2999	≥3000	p
	n=123	n=77	n=61	n=36	
Tasa de gestación (%)	61,3	57,4	55,6	72,7	0,583
Tasa de implantación (%)	31,3	37,9	31,6	39,2	0,314
Tasa de aborto (%)	18,7	17	11,1	22,7	0,677

Tabla 8. Resultados reproductivos en función de las concentraciones séricas de estradiol

3.3. Concentraciones de progesterona el día de la inducción de la ovulación.

3.3.1. Efecto de las concentraciones séricas de progesterona sobre la cinética de desarrollo embrionario. A pesar de la influencia de las concentraciones séricas de progesterona sobre los primeros ciclos celulares del desarrollo embrionario, no es posible definir un intervalo concreto en el que se observe un patrón uniforme de la cinética embrionaria (Tabla 9); a pesar de encontrar diferencias significativas (* $p \leq 0.05$) en los primeros estadios de división embrionaria, estas diferencias no pueden atribuirse a un rango concreto de niveles de progesterona sérica el día de la inducción de la ovulación, pues la distribución de estas diferencias es caótica (Figura 26).

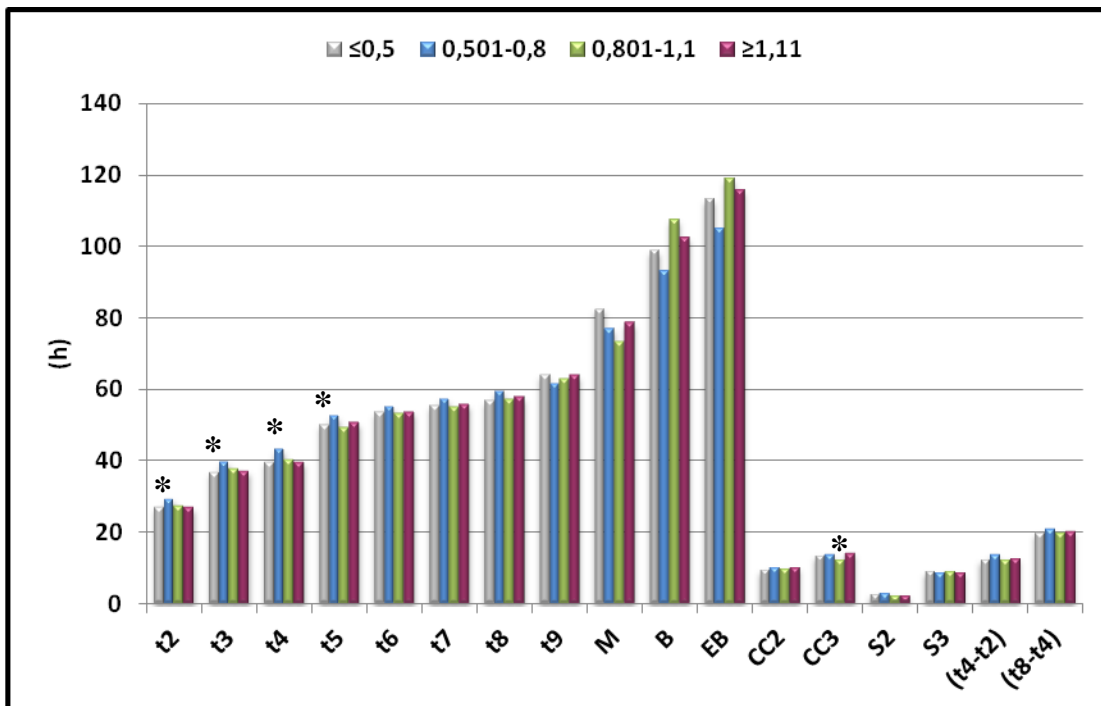


Figura 26. Efecto de las concentraciones séricas de progesterona sobre la cinética de desarrollo embrionario

	<0.5	IC 95%	0.501-0.8	IC 95%	0.801-1.1	IC 95%	>1.11	IC 96%	p
Embriones	n=572		n=306		n=511		n=633		
T2 (h)	27.0^a	26.4-27.6	29.2^b	28.2-30.2	27.4	26.8-28.0	26.8^a	26.2-27.4	0.000
T3 (h)	36.8^a	36.0-37.4	39.6^b	38.2-41.0	37.7	36.7-38.7	37.1^a	36.3-37.9	0.002
T4 (h)	39.6^a	38.8-40.4	43.0^b	41.3-44.7	40.1	39.1-41.1	39.5^a	38.7-40.3	0.000
T5 (h)	50.1	49.0-51.2	52.3^b	50.7-53.9	49.3^a	48.1-50.5	50.6	49.5-51.7	0.041
T6 (h)	53.5	52.4-54.6	54.9	53.5-56.3	53.0	51.8-54.2	53.6	52.5-54.7	0.304
T7 (h)	55.4	54.3-56.5	57.2	55.8-58.6	55.1	54.1-56.1	55.7	54.4-57.0	0.257
T8 (h)	56.7	55.5-57.9	59.4	57.5-61.3	57.2	55.9-58.5	57.7	56.2-59.2	0.198
T9+ (h)	64.0	61.5-66.5	61.3	58.2-64.4	62.8	59.8-65.8	63.9	61.8-66.0	0.863
M (h)	82.4	74.9-89.9	77.0	62.0-92.0	73.2	66.1-80.3	78.5	71.6-85.4	0.505
B (h)	98.8	85.1-112.5	93.0	81.0-105.0	107.5	75.7-139.3	102.5	96.1-108.9	0.754
BE (h)	113.2	93.6-132.8	105.0	90.0-120.0	119	110.0-128.0	115.7	106.1-125.3	0.788
CC2 (h)	9.4	8.8-10.0	10.1	9.2-11.0	9.9	9.2-10.6	10.1	9.6-10.6	0.332
CC3 (h)	13.4	12.7-14.1	13.8	12.6-15.0	12.3^a	11.3-13.3	14.2^b	13.4-15.5	0.014
S2 (h)	2.6	2.0-3.2	3.1	1.9-4.3	2.2	1.6-2.8	2.2	1.7-2.7	0.268
S3 (h)	8.9	7.5-10.3	8.6	6.3-10.9	9.0	7.4-10.6	8.7	7.3-10.1	0.988
T4-T2 (h)	12.3	11.8-12.8	13.7	12.4-15.0	12.4	11.7-13.1	12.7	12.2-13.2	0.095
T8-T4 (h)	19.8	18.7-20.9	20.7	19.1-22.3	19.7	18.6-20.8	20.2	19.0-21.4	0.794

Tabla 9. Cinética de desarrollo embrionario en función de la concentración de progesterona; a,b p≤0.05

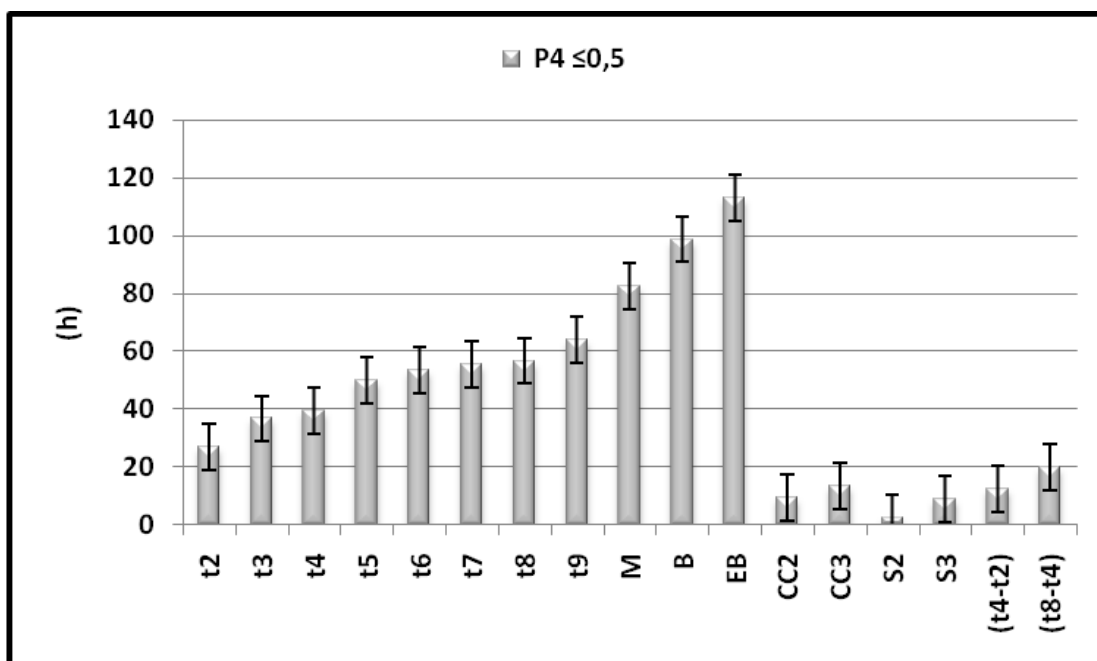


Figura 26a. Efecto de las concentraciones séricas de progesterona ($P4 \leq 0.5$) sobre la cinética de desarrollo embrionario

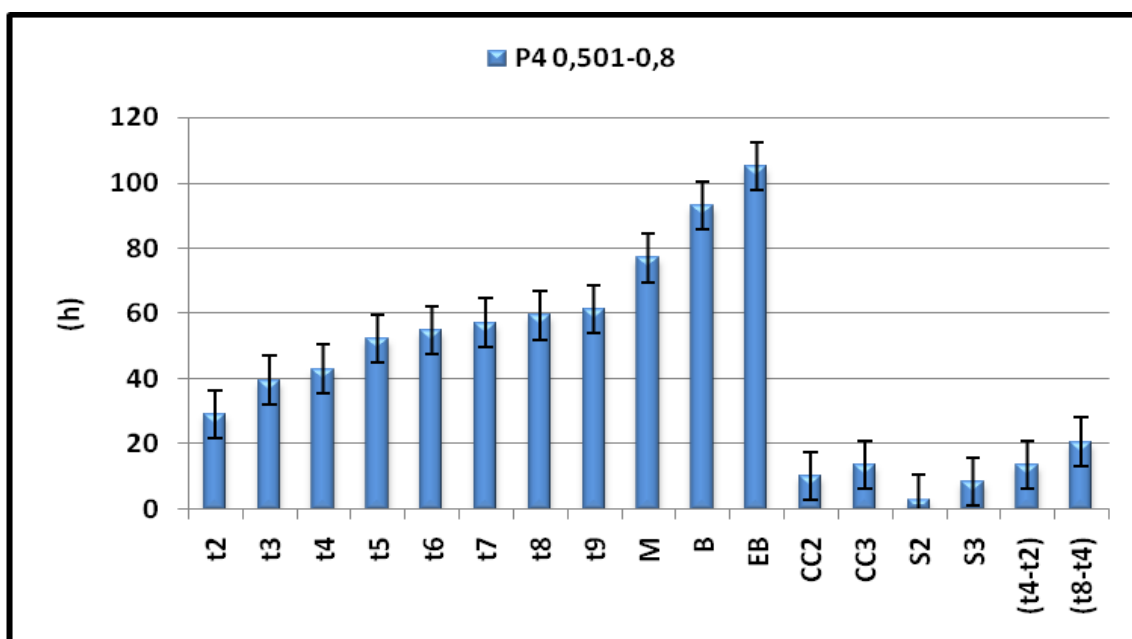


Figura 26b. Efecto de las concentraciones séricas de progesterona ($P4 0.501-0.8$) sobre la cinética de desarrollo embrionario

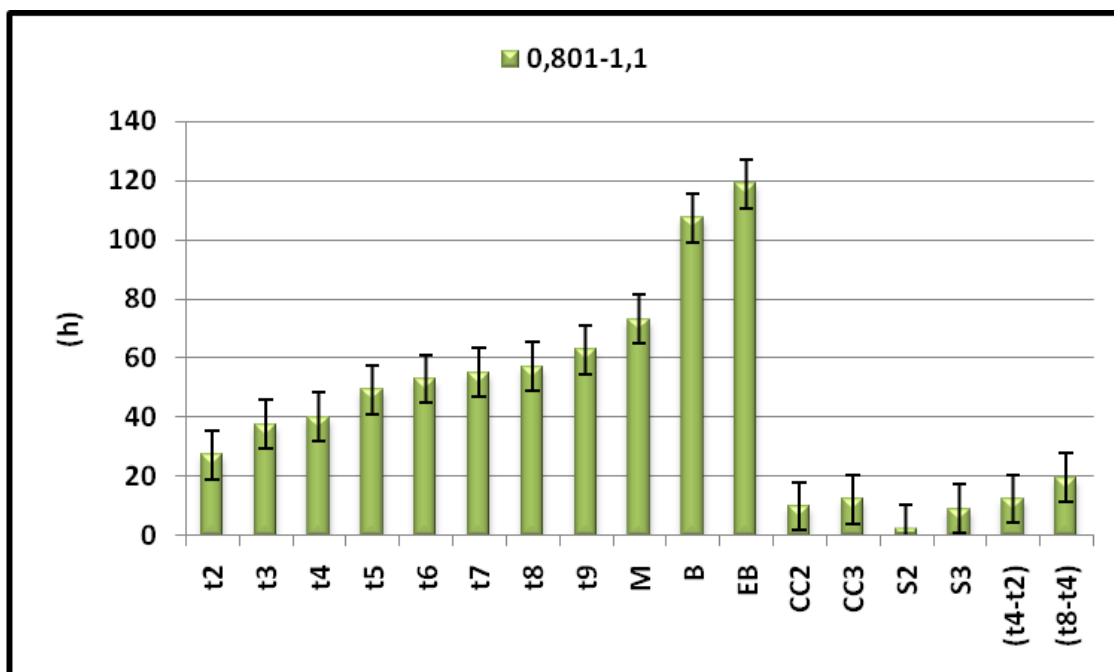


Figura 26c. Efecto de las concentraciones séricas de progesterona (P4 0.801-1.1) sobre la cinética de desarrollo embrionario

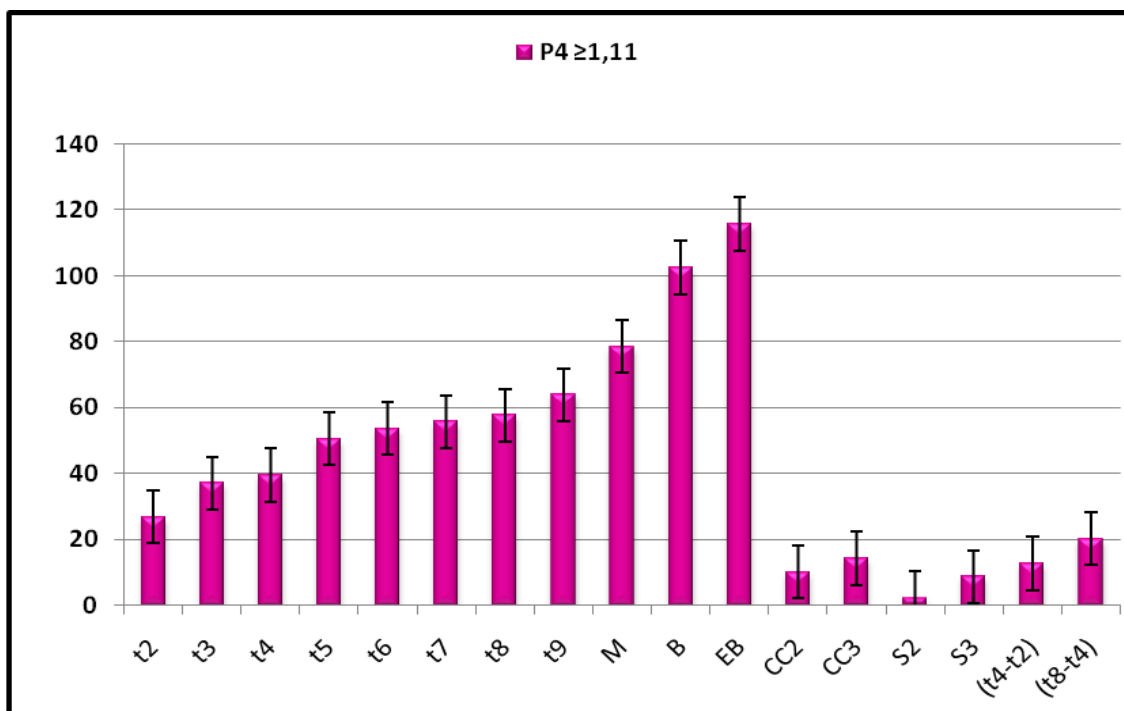


Figura 26d. Efecto de las concentraciones séricas de progesterona ($P4 \geq 1.11$) sobre la cinética de desarrollo embrionario

3.3.2. Rangos de tiempo y porcentaje de embriones óptimos. No se detectan diferencias estadísticas en la relación entre los valores de progesterona sérica y la fracción de embriones con unas características cinéticas muy determinadas pero resulta interesante destacar que las proporciones de embriones óptimos son muy similares tanto con altas como con bajas concentraciones de progesterona. Con estos resultados tan dispares, no es posible establecer una correlación entre unas concentraciones apropiadas de progesterona y una mejora, aunque no significativa, de la calidad cinética del embrión (Figura 27).

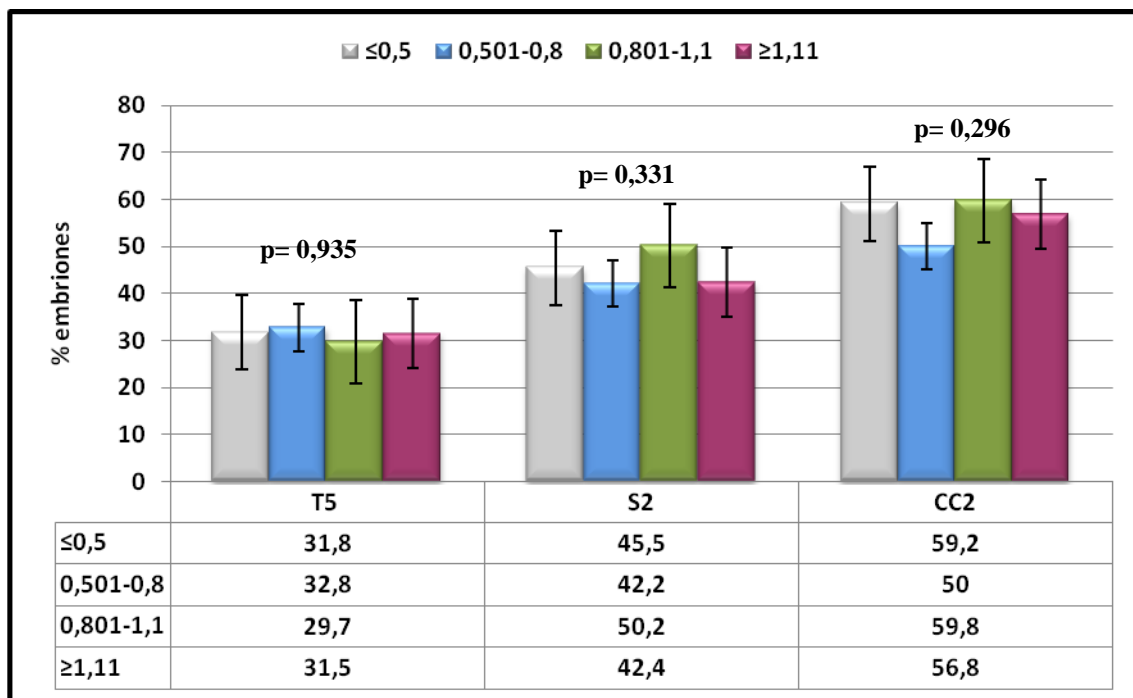


Figura 27. Porcentaje de embriones óptimos en función de las concentraciones sérica des progesterona

3.3.3 Distribución embrionaria y categorías morfocinéticas. La distribución de los embriones, clasificados según sus características morfocinéticas, es muy similar en todas las categorías del algoritmo; la ausencia de diferencias notables y patrones de asociación, impide inferir el efecto real de los niveles de progesterona sobre el potencial de implantación embrionario $p=0.721$ (Figura 28).

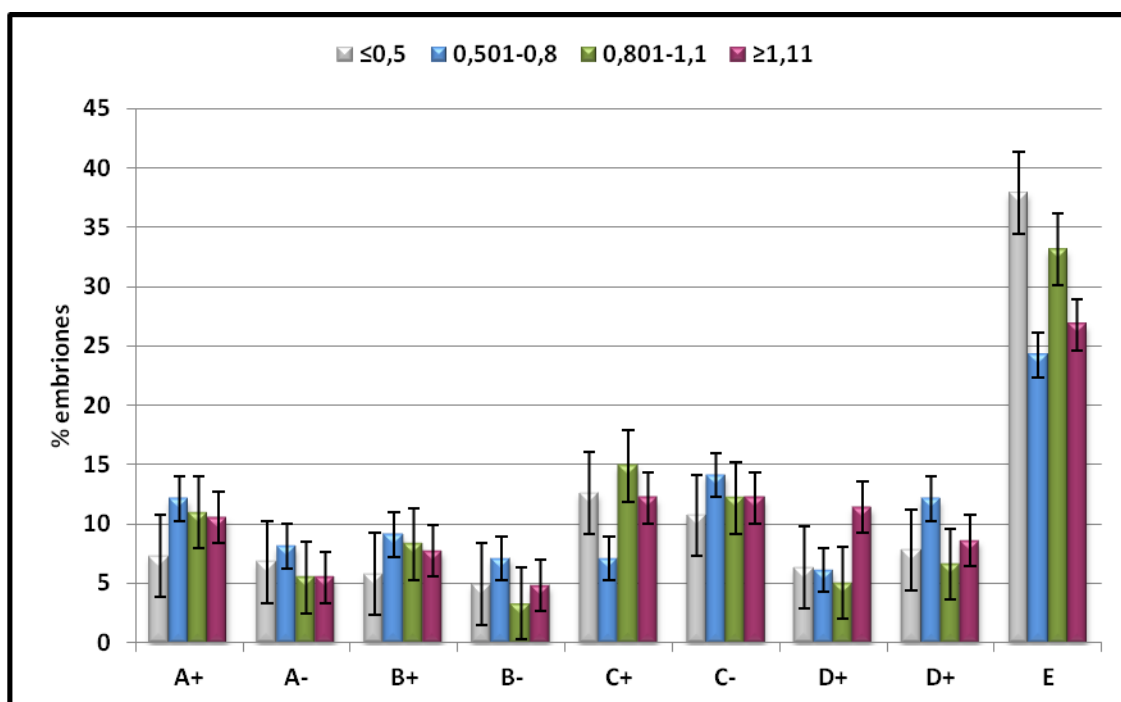


Figura 28. Distribución embrionaria en las categorías del algoritmo en función de las concentraciones séricas de progesterona ($p=0.721$).

3.3.4. Resultados reproductivos en función de las concentraciones séricas de progesterona. No se observan diferencias significativas en las tasas de gestación e implantación dependiendo de los niveles de progesterona el día en el que se administra una dosis única de agonistas de la GnRH para desencadenar la ovulación. La presencia de diferencias estadísticas en los resultados de cinética embrionaria no permite afirmar que exista una influencia real de los niveles de progesterona sobre los resultados clínicos (Tabla 10).

	≤0.5	0.501-0.8	0.801-1.1	≥1.11	<i>p</i>
	n=77	n=52	n=77	n=89	
<i>Tasa de gestación (%)</i>	59,4	55	58,1	59	0,990
<i>Tasa de implantación (%)</i>	29,4	32,3	33,8	35,6	0,395
<i>Tasa de aborto (%)</i>	21,9	10	9,7	23,1	0,335

Tabla 10. Resultados reproductivos en función de las concentraciones séricas de progesterona

DISCUSIÓN

Los programas de Reproducción Asistida representan el mayor avance de las últimas décadas en Medicina de la Reproducción y una inestimable ayuda para las parejas con problemas de fertilidad. El desarrollo de las tecnologías asociadas a estos nuevos métodos permite la observación de los procesos morfológicos que tienen lugar durante el desarrollo de embriones humanos, por lo que la información procedente de las observaciones realizadas al microscopio óptico ha contribuido significativamente a mejorar los resultados de los programas de fecundación *in vitro* (FIV).

Un punto fundamental para el éxito de estos programas de FIV es la identificación de los mejores embriones en el momento de la transferencia. Normalmente, en la práctica clínica los embriones se seleccionan de acuerdo a su morfología y su comportamiento en cultivo, ya que las evidencias disponibles indican que un sistema de clasificación basado en las características morfológicas ayuda a predecir el potencial de implantación. Sin embargo, los problemas derivados de la manipulación embrionaria limitan la frecuencia de las observaciones al microscopio fuera de unas condiciones controladas de cultivo, por lo que el conocimiento de los cambios morfológicos y de las tasas de crecimiento embrionario se deduce de la observación del embrión en periodos muy discretos de tiempo. Estas “imágenes congeladas” limitan la información disponible para el embriólogo; además, la naturaleza dinámica y gradual de la morfología celular puede enmascarar determinados hechos que sólo resultan visibles cuando las imágenes se condensan en una grabación continua y coherente (Payne et al. 1997).

La captura de imágenes mediante tecnología de time-lapse ayuda a minimizar las perturbaciones de las condiciones de cultivo integrando la observación y el propio cultivo en un único sistema (Nakahara et al. 2010). Esta nueva aplicación ha supuesto un avance considerable en la comprensión de los procesos que circundan a la fecundación y al desarrollo embrionario en humanos. La oportunidad de seguir el patrón dinámico del desarrollo embrionario mediante la monitorización derivada del time-lapse permite obtener información útil para la posterior selección embrionaria, al mismo tiempo que nos permite correlacionar un fenómeno ocurrido en un determinado momento con la capacidad del embrión para desarrollarse e implantar.

Por tanto, para lograr una tasa de implantación máxima con la transferencia de un único embrión es imprescindible una meticulosa selección embrionaria. El éxito de un

ciclo de FIV/ICSI depende sustancialmente de la calidad de los embriones transferidos y entre los numerosos factores que afectan a la calidad embrionaria hay que destacar a los protocolos de estimulación.

La GnRH desempeña un papel esencial en el control de la reproducción femenina; se une a receptores específicos en las células gonadotrópicas hipofisarias para estimular la secreción de FSH y LH, las cuales regulan la esteroidogénesis y la gametogénesis en el ovario. Los análogos de la GnRH son capaces de suprimir la liberación de gonadotropinas y, en consecuencia, la función gonadal. Esta afirmación constituye la base para su aplicación clínica de ahí el desarrollo de agonistas/antagonistas de la GnRH con este propósito.

En las dos últimas décadas, los agonistas se han empleado en los protocolos de estimulación ovárica en combinación con las gonadotropinas para prevenir un pico prematuro de LH; inducen un pico inicial de gonadotropinas antes de que se suprima su secreción debido a un proceso de desensibilización hipofisaria. En cuanto al mecanismo de acción de los antagonistas, la supresión de la secreción gonadotrópica ocurre por bloqueo competitivo del receptor. Se demuestra que los antagonistas resultan igual de efectivos que los agonistas a la hora de prevenir el pico prematuro de LH y su eficacia clínica se confirma en un amplio estudio multicéntrico desarrollado a escala europea (The Ganirelix Dose-finding Study Group 1998). En todos los estudios con antagonistas (independientemente de la dosis usada de 0.25 mg/día o 3 mg depot), la LH se suprime con éxito, se necesita menos cantidad de FSH, aumenta el grado de satisfacción del paciente y se reduce casi a la mitad el riesgo de hiperestimulación ovárica en comparación con los ciclos estimulados con agonistas. Además, no se observan diferencias en la cantidad de ovocitos recuperados, tasa de fecundación y calidad embrionaria; sin embargo, disminuye la concentración de estradiol y las tasas de gestación en curso son ligeramente más bajas (Fauser et al. 2000). Aunque no se describen diferencias significativas, es importante destacar que estos parámetros se agravan de forma dosis-dependiente lo que revela la existencia de una pequeña área de investigación clínica: la función de los análogos de la GnRH a nivel celular en los tejidos extrahipofisarios.

<i>Distribución</i>	<i>Hipofisaria</i>	<i>Tejidos reproductivos normales y tumorales; no reproductivos</i>
Secuencia cDNA	Igual	Igual
Afinidad por GnRH natural	Igual	Igual
Afinidad por agonistas	Alta	Baja
Acción de los antagonistas	Competitiva	Agonista
Actividad intracelular causada por la activación del receptor	Estimuladora; aumenta síntesis y secreción de gonadotropinas	Inhibidora; disminuye proliferación celular en tumores
Ruta de señalización	Gq/11 estimula a la PLC y ésta a la PKC	Gi activa al AMPc que reduce la actividad de las MAPK
Expresión en superficie celular	Dinámica; máxima expresión antes del pico de LH	Dinámica en ovario; depende del grado de desarrollo folicular

Tabla 11. Comparación entre receptores centrales y periféricos de GnRH

El descubrimiento de receptores extrahipofisarios de la GnRH desemboca en la publicación de numerosos artículos que llevan a un grupo de investigadores a apoyar la hipótesis según la cual, los antagonistas interaccionan con el programa mitótico de las células implicadas en la foliculogénesis, formación de blastómeras y desarrollo endometrial. Por ejemplo, Raga (Raga et al. 1999) indica que los antagonistas bloquean el desarrollo embrionario pre-implantatorio y Emons (Emons et al. 1993) concluye que restringen la proliferación celular al disminuir la síntesis de factores de crecimiento relacionados con la mitosis. Sin embargo, estos estudios plantean una serie de limitaciones a tener en cuenta:

- la mayoría de trabajos asume la capacidad de los antagonistas para activar el receptor de la GnRH; esta afirmación discrepa abiertamente de los resultados obtenidos por la mayoría de investigadores en cuanto al mecanismo de acción de los antagonistas,

los cuales carecen de efectos intrínsecos en el receptor y sólo pueden contrarrestar los efectos de la GnRH endógena y de los agonistas (Mannaerts and Gordon 2000)

- se trata de estudios *in vitro* con líneas celulares cancerígenas, que por definición se caracterizan por anomalías en los mecanismos de regulación.

Los resultados del presente trabajo muestran que los embriones derivados de ciclos estimulados con antagonistas comienzan, en general, a dividirse antes que los embriones derivados de ciclos estimulados con agonistas, aunque estas diferencias sólo son significativas en las primeras divisiones embrionarias, y más concretamente, hasta el momento en el que el embrión alcanza el estadio de 5-células. Obviamente, estos resultados nos permiten excluir la hipótesis de la actividad antiproliferativa de los antagonistas de la GnRH; además, estos resultados se apoyan en el hecho de que los antagonistas se suspenden cuando se induce la ovulación y teniendo en cuenta que su vida media es de 30 horas (Duijkers et al. 1998) y que el embrión se transfiere 5-7 días después de la última dosis, el hipotético efecto perjudicial de los antagonistas sobre el desarrollo embrionario es altamente improbable (Kol et al. 1999).

La función de los análogos de la GnRH sobre estructuras como el ovario o las células de la granulosa ha supuesto un foco de debate desde el descubrimiento de los receptores extrahipofisarios de la GnRH en humanos. Los resultados contradictorios relacionados con la esteroidogénesis ovárica pueden deberse a factores como el tipo de protocolo aplicado y la dosis de gonadotropinas empleadas así como a diferencias metodológicas en los experimentos (Millar et al. 2001). El significado de los niveles séricos de esteroides durante el proceso de estimulación ovárica en un tratamiento de reproducción es controvertido debido a su importancia para el éxito del desarrollo folicular y la maduración ovocitaria.

Como ya se ha comentado previamente, los análogos de la GnRH pueden ejercer una acción directa sobre el ovario y que los embriones procedentes de ciclos estimulados con antagonistas presentan una cinética de desarrollo mas rápida, por lo que es posible pensar que el microambiente hormonal definido por el tipo de análogo puede tener cierta relevancia en el posterior desarrollo del folículo pre-ovulatorio, en la calidad ovocitaria y en los resultados del ciclo de FIV. Además, la dinámica del desarrollo embrionario refleja el potencial de desarrollo del propio embrión. Existen numerosos trabajos

(Fenwick et al. 2002, Lundin et al. 2001, Van Montfoort et al. 2004) que apuntan hacia la división temprana como un potente indicador de la competencia embrionaria, de modo que aquellos embriones que comienzan a dividirse antes presentan mejores perspectivas evolutivas; sin embargo, las últimas investigaciones revelan que en algunas ocasiones las divisiones embrionarias ocurren demasiado temprano, lo cual va en detrimento de la calidad embrionaria, y apoya la existencia de rangos óptimos de división celular (Meseguer et al. 2011).

Cuando se comparan las concentraciones de hormonas esteroideas entre protocolos con agonistas y/o antagonistas, los valores de estradiol el día de la hCG son significativamente más bajos en los ciclos con antagonistas, debido a una acción directa del fármaco sobre las células ováricas que induce menos actividad aromatasa en las células de la granulosa (García-Velasco et al. 2001, Minaretzis et al. 1995). La caída en las concentraciones de LH circulantes se traduce en una disminución de la síntesis de andrógenos por las células de la teca y en consecuencia, hay menos sustratos para la conversión de estradiol. El descenso en la concentración de estradiol sérico se refleja en el fluido folicular por lo que se sugiere un posible efecto de los antagonistas sobre la producción ovárica de estradiol sin afectar al crecimiento folicular, ya que no se obtienen diferencias significativas en los porcentajes de ovocitos metafase II y las tasas de fecundación entre protocolos con agonistas y antagonistas. Según este planteamiento, el perfil hormonal de los ciclos con agonistas al final de la fase folicular se caracteriza por unas elevadas concentraciones de estradiol y progesterona que favorecen la maduración ovocitaria del citoplasma y el núcleo respectivamente, por lo que la obtención de ovocitos, en teoría, de buena calidad debería reflejarse en el desarrollo embrionario, de modo que los embriones procedentes de estos ciclos se dividieran antes que los embriones derivados de protocolos con antagonistas.

Sin embargo, los resultados obtenidos muestran exactamente lo contrario: en los ciclos con antagonistas los embriones se dividen antes; indirectamente, estos datos señalan una mayor calidad de los gametos obtenidos con este análogo de la GnRH y mejores perspectivas de desarrollo embrionario. Teniendo en cuenta estos argumentos y que una de las posibles hipótesis que se barajan para explicar por qué unos embriones se dividen antes que otros se relaciona con el grado de madurez ovocitaria (Herbert et al.

1997), es posible plantear que las diferencias cinéticas observadas en función del protocolo de estimulación tengan su origen en un patrón cronológico diferencial del proceso de maduración ovocitaria. Estos resultados pueden explicarse desde dos puntos de vista:

1.- el ambiente hormonal derivado de una estimulación con antagonistas deriva en unas concentraciones de estradiol y progesterona que van a favorecer el proceso de maduración ovocitaria, y en consecuencia, el desarrollo embrionario. Esta hipótesis plantea que los valores de estradiol y progesterona que se alcanzan el día de la hCG en un ciclo con agonistas son lo suficientemente elevados como para afectar a la maduración del ovocito, y que este hecho se vea reflejado en la cinética de desarrollo embrionario, ya que el inicio de los ciclos celulares se ve significativamente ralentizado en las primeras divisiones embrionarias, que son además las más sensibles a la influencia de agentes externos, en este caso, el tipo de análogo de la GnRH empleado para la estimulación ovárica.

2.- las propias características de los análogos de la GnRH, no sólo afectan al perfil hormonal al final de la fase folicular, sino que estas diferencias ya son evidentes al inicio de la estimulación. La teoría de las 2-células/ 2-gonadotropinas puede explicar por qué un tratamiento con FSH recombinante en presencia de una LH no suprimida conduce a una aceleración de la maduración ovocitaria, y en consecuencia, de la cinética de desarrollo. Una concentración elevada de LH al comenzar el tratamiento estimula la síntesis de estrógenos en las células de la granulosa por acción de la FSH, a través de una mayor producción de andrógenos por parte de las células de la teca. Esta situación supone una expresión temprana de los receptores de progesterona, los cuales se sabe que están regulados por los niveles circulantes de estradiol (Bouchard et al. 1991), de modo que si las hormonas esteroideas son importantes en los procesos de maduración ovocitaria, el aumento en las concentraciones de estradiol y progesterona al inicio de la fase folicular acelera este proceso, por lo que los ovocitos maduran antes y en consecuencia, los embriones comienzan a dividirse antes.

A pesar de que se describe una influencia real del tipo de análogo de la GnRH sobre el desarrollo embrionario, estas diferencias no se traducen en un aumento del potencial de implantación. La definición de embrión óptimo se basa en un estudio

publicado recientemente (Meseguer et al. 2011) en el que se establecen unos rangos de tiempo óptimos para cada una de las variables cinéticas evaluadas, de modo que los embriones con tiempos de división embrionaria incluidos dentro de este intervalo tienen una mayor probabilidad de implantación que los embriones con una cinética definida como “fuera de rango”; además, los autores establecen que las variables de tiempo con mayor valor predictivo son el tiempo de división a un embrión de 5-células (T5), la duración del segundo ciclo celular (CC2) y la sincronía en las divisiones celulares en la transición de un embrión de 2- a 4-células. Al mismo tiempo, describen una serie de parámetros morfológicos relacionados con bajas tasas de implantación y que se utilizan como criterios de exclusión en los procedimientos de selección embrionaria: embriones asimétricos en estadio de 2-células, división directa desde cigoto a embrión de 3-células y multinucleación en fase de 4-células.

Cuando se evalúa la proporción de embriones óptimos y por tanto, con mayor potencial de implantación, en las variables de tiempo de mayor potencial predictivo, no se encuentran diferencias significativas en función del tipo de análogo de la GnRH empleado para la estimulación ovárica. La ausencia de diferencias hace referencia tanto a la proporción de embriones óptimos según el protocolo de estimulación como al porcentaje de embriones dentro y fuera de rango en un protocolo en particular. A pesar de las diferentes publicaciones que sugieren que cuánto antes se divide un embrión mayor es la probabilidad que tiene de implantar (McKiernan and Bavister 1994) y que se ha aceptado como norma general que la división temprana es un buen indicador de competencia del desarrollo embrionario en comparación con divisiones mas tardías (Giorgetti et al. 2007, Terriou et al. 2007), los resultados obtenidos por el grupo de Meseguer indican que las divisiones embrionarias que se inician demasiado pronto (por ejemplo, menos de 48.8 horas para T5) afectan negativamente a las tasas de implantación apoyando la existencia de intervalos óptimos de tiempo para cada una de las divisiones celulares.

Estas consideraciones podrían actuar como punto de partida para explicar por qué las diferencias significativas observadas en los tiempos de división embrionaria dependiendo del tipo de análogo de la GnRH no tienen una respuesta equivalente en las proporciones de embriones óptimos. Si consideramos las medias de los tiempos de

división para las variables evaluadas con agonistas y antagonistas respectivamente, T5 50.7 horas vs 49.8 horas, $p=0.027$; CC2, 10.2 horas vs 9.8 horas, $p=0.098$; S2, 2.1 horas vs 2.3 horas, observamos que las diferencias en cuanto a valores absolutos son mínimas y que solo se observan diferencias significativas en T5; estos resultados indican que, a pesar del efecto real de los protocolos de estimulación sobre la cinética de las primeras divisiones embrionarias, las diferencias en los tiempos medios de división son tan pequeñas que este efecto no se traduce en un aumento real de las posibilidades de implantación sobre todo en lo referente al porcentaje de embriones óptimos en T5.

El siguiente paso fue aplicar el algoritmo desarrollado por Meseguer, con el objetivo de conocer cómo se distribuyen los embriones en cada una de las categorías del algoritmo en función de si se emplean agonistas o antagonistas en los tratamientos de estimulación ovárica controlada. La clasificación jerárquica se inicia con un examen morfológico en el que se excluye a los embriones que cumplen con algunos de los criterios de exclusión (clase E) y los niveles posteriores siguen una estricta jerarquía basada en las variables binarias de tiempo T5, CC2 y S2.

Al igual que ocurría con los resultados expuestos anteriormente, tampoco se observan diferencias significativas cuando examinamos la proporción de embriones en cada una de las categorías descritas por el algoritmo en función del tipo de análogo empleado en el protocolo de estimulación. En primer lugar, destaca la proporción de embriones de clase E en los ciclos con antagonistas, que es ligeramente menor que en los ciclos con agonistas; la elevada proporción de embriones con anomalías morfológicas se relaciona con el hecho de que independientemente del número total de embriones transferidos en ciclos consecutivos, existe un porcentaje de los mismos que nunca alcanzan el objetivo deseado (Garrido et al. 2011) y que probablemente se deba a que sus características morfológicas condicionan unas posibilidades muy bajas de implantación.

Estos datos sugieren que la influencia real de los protocolos de estimulación sobre el desarrollo embrionario está limitada a las variables cinéticas, puesto que no se observan variaciones relevantes en cuanto a las características morfológicas que actúan como criterios de exclusión. Respecto a las categorías definidas por las variables binarias, los resultados son similares a los expuestos anteriormente; la ausencia de diferencias notables entre ambos grupos de estudio nos permite concluir que la influencia

de los protocolos de estimulación sobre la calidad del ovocito y del desarrollo embrionario únicamente se refleja en los tiempos de división embrionaria y no se amplía a un aumento real de las posibilidades de implantación y de la mejora de las características morfológicas.

Sin embargo, estos resultados no pueden considerarse como concluyentes ya que dentro de los protocolos de estimulación que estamos considerando hay que tener en cuenta al segundo factor del binomio análogo de la GnRH/agente inductor de la ovulación; es decir, no podemos descartar que las diferencias cinéticas observadas en el desarrollo embrionario se deban al modo en el que se desencadena la ovulación.

La gonadotropina coriónica humana (hCG) representa el método estándar de tratamiento en la sustitución del pico endógeno de LH y en la inducción de las etapas finales de la maduración ovocitaria durante la estimulación ovárica controlada en un tratamiento de reproducción. Desafortunadamente, la hCG también parece contribuir al desarrollo del síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO); la hCG está implicada en el desarrollo de múltiples cuerpos lúteos y presenta un efecto luteotrópico prolongado debido a su larga vida media en comparación con la LH natural. El desarrollo de los antagonistas de la GnRH permite el empleo de agonistas como alternativa a la hCG en el momento de desencadenar la ovulación; el agonista desplaza al antagonista del receptor de la GnRH el cual se activa generando un “flare up” inicial de gonadotropinas endógenas previo a la desensibilización del propio receptor. Existen estudios previos que han demostrado la eficacia de los agonistas como inductores de la ovulación y de la maduración final del ovocito (Gonen et al. 1990, Itskovitz et al. 1991) . Sin embargo, también se describen diferencias entre el pico de LH inducido por los agonistas y el pico natural; el pico de LH inducido por los agonistas es más corto (24-36 horas vs 48 horas) lo que indica una reducción significativa de la cantidad total de gonadotropinas (FSH y LH) liberadas desde la hipófisis cuando se emplea un agonista de la GnRH para desencadenar la ovulación.

Una posible ventaja de los agonistas sobre la hCG en la inducción del pico de LH deriva de la aparición simultánea de un crecimiento paralelo de FSH que imita al pico correspondiente del ciclo natural. Aunque la función de este incremento de FSH del ciclo natural no se ha especificado, se ha visto que promueve la expresión de receptores LH en

las células de la granulosa, la maduración nuclear del ovocito y la expansión del cúmulo (Yding Andersen 2002) . El hecho de que se recuperen más ovocitos en metafase II después de inducir con agonistas sugiere un perfil más fisiológico y cercano al ciclo natural (Humaidan et al. 2005, Humaidan et al. 2010, Oktay et al. 2010).

En un ciclo menstrual normal, el pico de mitad de ciclo de FSH y LH es un suceso complejo y cuidadosamente orquestado provocado en la fase folicular tardía por concentraciones elevadas de estradiol en combinación con un pequeño pero distintivo incremento de progesterona. La estimulación masiva pero transitoria por parte de la LH induce la aparición de dos sucesos básicos en el folículo: la maduración ovocitaria y el propio proceso ovulatorio que incluyen la reanudación de la meiosis ovocitaria, la ruptura del folículo dominante y la liberación de un ovocito potencialmente fecundable así como la luteinización de las células de la granulosa y de las células de la teca que conducen a la formación del cuerpo lúteo. Estos dos sucesos se activan con diferentes concentraciones de gonadotropinas y parece ser que la inducción de la ovulación depende de la cantidad total de gonadotropinas más que de la propia hormona gonadotrópica de modo que el pico atenuado inducido por los agonistas puede afectar a la maduración ovocitaria de forma distinta a como lo hace la hCG (Andersen et al. 2006) . Debido a la liberación endógena de gonadotropinas, la FSH y la LH están más elevadas en los ciclos desencadenados con agonistas pero en los ciclos inducidos con hCG, estas menores concentraciones de gonadotropinas se ven compensadas por las altas concentraciones de la propia hCG. Los elevados niveles de FSH y LH intrafoliculares en los tratamientos inducidos con agonistas confirman la existencia de un pico entre la inyección del agonista y la aspiración ovocitaria, pero las concentraciones medias no parecen superar los valores que se alcanzan con la hCG en cualquier punto que se considere, por lo que se demuestra que la señal ovulatoria es más intensa en los tratamientos inducidos con hCG en comparación con los agonistas de la GnRH.

Aunque se trata de un tema crítico para la fertilidad, la función concreta de la LH a la hora de promover las etapas finales de la maduración ovocitaria sólo se comprende parcialmente. El desarrollo folicular y la ovulación definen un diálogo continuo entre las células somáticas y el ovocito. Las células murales de la granulosa, las células del cúmulo y los ovocitos están interconectados a través de “gap junction” que permiten el flujo de

mediadores intracelulares desde la periferia al corazón del folículo; alternatively, los factores liberados por las células murales de la granulosa pueden transmitir el estímulo de la LH a las células del cúmulo y al ovocito. Teniendo en cuenta su función como mediadores del crecimiento celular y como intermediarios potenciales en rutas de señalización autocrina/paracrina, se explora la posibilidad de que factores de crecimiento como el EGF y ligandos asociados a su receptor como la anfiregulina (AR), la epiregulina (EPI) y la betacelulina (BTC) tuvieran cierta importancia en los procesos que regulan la ovulación y la fertilidad (Conti et al. 2006).

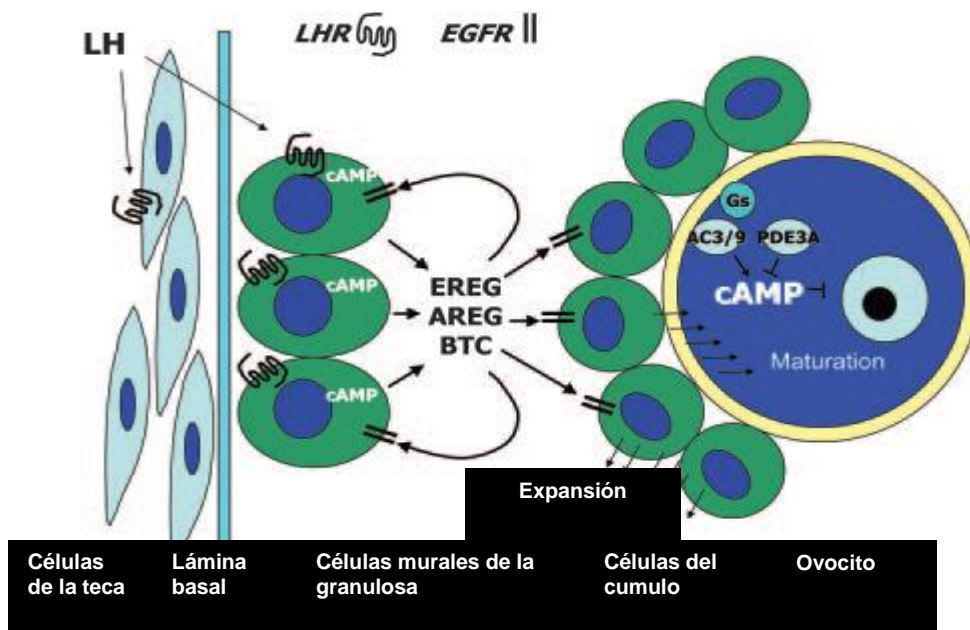


Figura 29. Modelo de la regulación de la LH sobre la red de EGF-like en diferentes células del folículo ovárico (Conti et al. 2006)

Park (Park et al. 2004) demuestra que la LH (hCG), tanto endógena como exógena, es capaz de inducir un rápido aumento en la expresión de genes que codifican para estos factores que participan en la expansión del complejo cúmulo-ovocito y en la recapitulación de los cambios morfológicos y bioquímicos inducidos por la LH y que repercuten sobre la maduración ovocitaria. Un estudio reciente revela que la manera de desencadenar la ovulación afecta a la síntesis de anfiregulina, ya que se obtienen concentraciones significativamente más altas de este factor de crecimiento cuando se

emplea hCG en comparación con el ciclo natural o el uso de agonistas de la GnRH; sin embargo, la cantidad de ovocitos metafase II y de embriones potencialmente transferibles aumenta en los ciclos inducidos con agonistas (Humaidan et al. 2011).

La inducción de la ovulación bien con agonistas de la GnRH bien con hCG supone la aparición de profundas diferencias en el medio folicular pre-ovulatorio en conexión con un tratamiento de infertilidad; por otro lado, se sabe que la cronología del desarrollo embrionario puede verse afectada por el grado de madurez del ovocito. Los resultados de este estudio indican cierto avance en el desarrollo embrionario en los ciclos desencadenados con agonistas de la GnRH, y que esta ventaja alcanza significación estadística en las primeras divisiones embrionarias; el hecho de que la señal producida por los agonistas de la GnRH se acerque a las características del pico de LH de un ciclo natural, explicaría la progresión en la cinética de desarrollo de estos embriones, que tendría su origen en el mismo momento de la ovulación. Sin embargo, estos resultados difieren de las teorías expuestas hasta ahora, ya que si la señal procedente de la hCG es mas fuerte y duradera y la expresión de AR es dosis-dependiente, los embriones derivados de estos ciclos deberían comenzar a dividirse antes; estas consideraciones desembocan en el concepto de “techo” de anfiregulina, por encima del cual la competencia del ovocito disminuye con respecto a una señal menos intensa en cuanto a términos de cinética embrionaria.

Al desencadenar la ovulación con hCG, la señal ovulatoria es más intensa y prolongada en el tiempo pero con los agonistas se obtiene un pico endógeno de LH que eleva las concentraciones foliculares de la hormona lo que se traduce en un aumento notorio en la concentración de factores EGF-like, los cuales son capaces de acelerar la re-entrada en el ciclo celular meiótico y la maduración ovocitaria. Las similitudes entre el pico de LH en un ciclo natural y el derivado de un ciclo inducido con agonistas, sobre todo en lo relacionado con la liberación de gonadotropinas endógenas, nos lleva a pensar que los niveles de LH que se alcanzan con los agonistas conducen a la expresión de unos niveles adecuados de anfiregulina que en ultima instancia optimizan las etapas finales de la maduración ovocitaria con las consecuencias que eso conlleva en concepto de calidad de la cohorte embrionaria. Por lo tanto, es posible asumir que la manera en la que se desencadena la ovulación implica la aparición de perfiles hormonales altamente

diferenciales que ejercen una influencia real sobre la cinética de desarrollo embrionario; es decir, el hecho de emplear hCG y/o agonistas de la GnRH en la maduración y ovulación final del ovocito determina el inicio de los ciclos celulares así como la calidad de la cohorte tanto ovocitaria como embrionaria.

La siguiente cuestión es tratar de determinar si esta celeridad en la cinética de desarrollo se traduce en una mejoría de la calidad embrionaria y en una mejora de los resultados del ciclo. Los trabajos publicados hasta el momento referentes a este asunto son bastante contradictorios ya que hay trabajos que demuestran que la calidad embrionaria mejora con los agonistas de la GnRH (Oktay et al. 2010) y estudios que no encuentran ninguna diferencia relevante (Melo et al. 2009a). A pesar de que hemos comentado que el aumento en la expresión de AR acelera la maduración del ovocito, este hecho no implica mayor competencia en la calidad embrionaria (Humaidan et al. 2011, Inoue et al. 2009); en ambos trabajos se observa que la concentración de AR es inversamente proporcional a la cantidad de ovocitos metafase II recuperados y al número de embriones transferibles.

A la hora de determinar la proporción de embriones óptimos en cada uno de los intervalos de tiempo que predicen un mayor potencial de implantación, los resultados coinciden con los de estudios anteriores. A pesar de que los niveles de anfiregulina son menores en los ciclos desencadenados con agonistas, se alcanzarían unas concentraciones adecuadas que aumentan ligeramente la cantidad de embriones cuya cinética embrionaria condiciona mayores perspectivas de desarrollo; la ausencia de diferencias significativas indica que las variaciones cinéticas dependientes del agente inductor de la ovulación no son lo suficientemente importantes como para condicionar los posteriores resultados clínicos. El hecho de que se obtenga una fracción ligeramente mayor de embriones óptimos en los ciclos inducidos con agonistas no implica que el uso de hCG empeore notablemente la calidad de la cohorte a pesar de que la velocidad de desarrollo embrionario es sensiblemente más lenta en los primeros ciclos celulares. Posteriormente, la distribución de los embriones entre las distintas categorías del algoritmo, no difiere de lo anterior. A pesar de que no es posible describir implicaciones clínicas, los embriones con mejores características morfocinéticas son ligeramente más abundantes en los protocolos inducidos con agonistas de la GnRH.

Estos resultados también ponen de manifiesto la posibilidad de inducir la ovulación con agonistas de la GnRH sin comprometer la calidad embrionaria, contradiciendo aquellas opiniones que sugieren que la insuficiencia de cuerpo lúteo derivada de la inducción de la ovulación con agonistas de la GnRH presenta un impacto negativo sobre la calidad del ovocito/embrión para justificar los malos resultados iniciales de los ciclos de FIV (Beckers et al. 2003) . Estimular la maduración ovocitaria con agonistas de la GnRH en ciclos de estimulación ovárica controlada reproduce condiciones más fisiológicas y cercanas a las de un ciclo no estimulado; las dosis de agonistas administradas unas 12 horas después de la última inyección del antagonista son suficientes para desplazar al antagonista del receptor de la GnRH y a pesar de que el pico de LH en estos ciclos es más breve, sí es capaz de originar una maduración ovocitaria adecuada lo que se convierte en una buena representación de embriones óptimos, caracterizados por una cinética embrionaria concreta y mayor posibilidad de implantación.

Por último, los resultados reproductivos confirman todas las consideraciones anteriores; las tasas de gestación e implantación mejoran notablemente con los antagonistas en los procesos de estimulación ovárica y con los agonistas para desencadenar la ovulación, aunque estas diferencias no se traduzcan en un aumento de las posibilidades reales que tiene una pareja de conseguir una gestación.

Considerando el protocolo de estimulación en su conjunto, no se puede afirmar que las diferencias observadas en cuanto a la cinética de desarrollo embrionario se deban exclusivamente a uno de los dos factores considerados, ya que para ambos casos se han descrito mecanismos que aceleran el inicio de las divisiones embrionarias. El hecho de que los embriones procedentes de ciclos de estimulación con el par antagonistas de la GnRH/agonistas de la GnRH puede deberse tanto al perfil hormonal determinado por los protocolos con antagonistas al inicio de la fase folicular como a la similitud con el pico de LH de un ciclo natural que se obtiene al inducir la ovulación con un agonista de la GnRH.

Los estudios relacionados con la cinética de desarrollo sugieren que aquellos embriones que se dividen antes, pero siempre dentro de unos márgenes concretos, tienen más posibilidades de evolucionar a blastocisto y en consecuencia, mayores posibilidades

de implantación y también se sabe que el objetivo de los protocolos actuales de estimulación ovárica es rentabilizar al máximo el tratamiento. El hecho de que la superioridad cinética adquirida por la combinación antagonistas/agonistas no se traduzca en una ventaja evidente de las posibilidades de gestación, permite afirmar la idoneidad de ambos procedimientos en los ciclos de fecundación *in vitro* sin que sea posible demostrar una clara superioridad de una estrategia sobre la otra.

Las **gonadotropinas exógenas** son esenciales en los tratamientos de reproducción asistida como en la inducción de la ovulación, inseminaciones artificiales y ciclos de FIV. La primera preparación disponible fue la gonadotropina menopáusica humana (HMG) que contiene 75 UI FSH + 75 UI LH, pero la mayor parte del contenido proteico de este fármaco (>90%) consistía en proteínas urinarias no relacionadas con las gonadotropinas. Durante un ciclo normalizado de estimulación ovárica con HMG, se administran algunos miligramos de proteínas no relevantes que pueden generar efectos no deseados incluyendo alergias y/u otras reacciones de hipersensibilidad.

La secuencia posterior en los procesos de desarrollo de gonadotropinas sintéticas incluye a la FSH urinaria con muy poca LH y proteínas no-relevantes; se continúa con la FSH urinaria altamente purificada que apenas contiene LH y finalmente se sintetiza la FSH recombinante. Tanto la HMG, como la FSH urinaria y la FSH recombinante se emplean rutinariamente en los ciclos de estimulación ovárica controlada. Estos procesos conducen a la síntesis de preparaciones cada vez más puras de FSH debido al concepto según el cual la LH era redundante y a la rápida introducción de la FSH recombinante en el mercado por parte de la industria farmacéutica (Van Wely et al. 2008).

La gran mayoría de parejas candidatas a un tratamiento de reproducción pasan por un proceso de estimulación ovárica controlada en el que se emplean gonadotropinas exógenas para inducir el desarrollo multifolicular. Durante estos tratamientos, la aparición frecuente de picos precoces de LH suponía cancelar la mayor parte de los ciclos debido a una luteinización prematura; este hecho condujo eventualmente a la introducción de los agonistas de la GnRH, de modo que disminuyeron las tasas de cancelación y aumentaron las tasas de gestación (Venetis et al. 2009). En ese momento, no se prestó mucha atención a los bajos niveles circulantes de LH consecuencia de la desensibilización hipofisaria, principalmente por el hecho de que la estimulación ovárica

se hacía con preparados que contenían dicha hormona. La introducción de gonadotropinas libres de actividad LH hizo resurgir el interés por su papel en los procesos de estimulación ovárica; desde entonces, la importancia de la LH en la actividad folicular y de su potencial durante los tratamientos de estimulación en ciclos de FIV ha sido objeto de investigación por numerosos autores.

La disponibilidad de FSH y LH recombinante así como de antagonistas de la GnRH ayudan a una evaluación *in vivo* más precisa del modelo 2 células- 2 gonadotropinas; estas herramientas farmacológicas aportan nuevos puntos de vista al papel fisiológico de la FSH y la LH en el desarrollo folicular y la maduración ovocitaria, y finalmente, suponen una oportunidad única para personalizar los protocolos de estimulación de acuerdo a la historia clínica de cada pareja y a la respuesta en tratamientos previos.

Esta actividad LH puede incorporarse como HMG, LH recombinante, hCG y hCG recombinante; el hecho de disponer de varias alternativas permite el diseño de diferentes protocolos de estimulación que incorporan actividad LH durante la fase folicular en alguna de estas formas en un intento de optimizar los resultados de la estimulación ovárica. En este trabajo en concreto, se pretende evaluar la posible influencia del tipo de gonadotropina sobre la cinética de desarrollo embrionario y su posterior impacto sobre la calidad embrionaria y el potencial de implantación; para ello, se trabaja con un protocolo largo con agonistas, se emplea una de las siguientes alternativas como preparado gonadotrópico, HMG, FSH recombinante y FSH +HMG, y se desencadena la ovulación con hCG.

En una primera valoración, la principal diferencia entre los tratamientos anteriores es la presencia o no de actividad LH, puesto que la FSH recombinante es una gonadotropina de origen sintético que carece por completo de esta hormona, y la HMG se caracteriza por contener tanto FSH como LH en proporción 1:1 (75 UI de FSH urinaria: 75 UI LH urinaria); la actividad LH deriva de la combinación LH+hCG característica de estas combinaciones. Otras diferencias entre las tres preparaciones estudiadas se localizan en la presencia de distintas isoformas de la FSH y en el grado de actividad biológica tanto de la LH como de la hCG.

En cuanto al papel de la LH en la foliculogénesis, existen una serie de observaciones endocrino-fisiológicas que indican una función clave de la LH en el crecimiento folicular, particularmente en la selección del folículo dominante. Los datos clínicos procedentes de una estimulación ovárica controlada sugieren que la mayoría de mujeres normogonadotropas logran un desarrollo multifolicular adecuado mediante la administración únicamente de FSH. El presente trabajo se lleva a cabo con donantes y por tanto con ciclos de buen pronóstico donde se observa que las cantidades residuales de LH post-agonistas de la GnRH son capaces de sostener las actividades locales relacionadas con el crecimiento y dominancia folicular (Alviggi et al. 2006).

Otro punto en el que el tipo de gonadotropina podría influir en los resultados globales de un ciclo de FIV es sobre la calidad embrionaria. Aunque se ha sugerido que la hipersecreción de LH podría estar relacionada con una función reproductiva pobre (Shoham et al. 1993), o que los niveles de LH de la fase folicular no se asociaban con los resultados del tratamiento (Balasch et al. 2001), hay otros estudios que sí indican cierta correlación entre los niveles de LH y el porcentaje de abortos espontáneos (Westergaard et al. 2000). Por lo tanto, también se describen conflictos evidentes acerca de la calidad ovocitaria/embrionaria en función de los distintos regímenes gonadotrópicos. Los primeros estudios (Imthurn et al. 1996, Mercan et al. 1997) indicaban una mayor proporción de ovocitos maduros en los ciclos tratados con FSH recombinante en comparación con ciclos con HMG; posteriormente, o bien se obtuvieron resultados contradictorios (Balasch et al. 2001) o no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de ovocitos metafase II entre HMG y FSH recombinante (Weissman et al. 1999). Sin embargo, en los últimos años se han publicado trabajos en los que se describe un efecto beneficioso evidente de la LH sobre el desarrollo embrionario ya que se ha observado que la LH mejora las tasas de diploidía embrionaria y por tanto de embriones fecundados correctamente (Weghofer et al. 2008) y la obtención de una mayor proporción de embriones de buena calidad en ciclos con HMG, a pesar de que se recuperan más ovocitos con la FSH recombinante (Ziebe et al. 2007).

El empleo de FSH y/o HMG también puede condicionar el perfil endocrino obtenido durante la estimulación ovárica. La actividad LH presente en la HMG induce una serie de cambios significativos en el perfil hormonal. A través de una serie de

variaciones en la ratio intrafolicular de esteroides, se observa una foliculogénesis diferencial que puede verse reflejada en la calidad del ovocito/embrión. Las concentraciones de FSH en suero y fluido folicular son mayores en los ciclos con HMG, posiblemente porque la vida media de la FSH es mayor. En cuanto a la LH, no se describen diferencias relevantes. Debido al componente hCG de la HMG más que a la propia LH, la hCG es responsable de la actividad LH por lo que su exposición durante el proceso de estimulación puede hacerla responsable de las diferencias en crecimiento y selección folicular. La presencia de más folículos con la FSH recombinante deriva en mayores concentraciones de E2 durante la primera mitad de la estimulación (Smitz et al. 2007). Por su parte, la HMG está relacionada con mayores niveles androgénicos, lo que aumenta la sensibilidad a la FSH al elevar la expresión de los receptores de FSH y actuar como depósito precursor para la aromatización de estrógenos. Se cree que el componente hCG de la HMG promueve la síntesis de andrógenos al principio de la estimulación y aumenta el crecimiento folicular selectivo, lo que desemboca en la presencia de folículos maduros estrogénicos al final de la estimulación (Andersen 2008).

Por último, y respecto a las concentraciones de progesterona, están aumentadas en presencia de FSH recombinante en comparación con los preparados que contienen actividad LH. Aunque los aumentos de la progesterona están históricamente asociados a la LH en el contexto de picos prematuros, se publicaron estudios que atribuyen este aumento a la exposición a FSH (Filicori et al. 2002). En los ciclos con HMG, la exposición a la FSH es más prolongada, hay mayor presencia de FSH en suero y existe un componente hCG pero esto no conduce al aumento de progesterona tal y como se observa en los ciclos con FSH recombinante; estas diferencias podrían explicarse por una serie de cambios en la regulación paracrina que afectarían a la síntesis de progesterona. Las células de la granulosa estimuladas por la FSH producen una serie de factores paracrinicos que bien estimulan la síntesis de progesterona bien disminuyen la actividad de un conjunto de enzimas que catalizan la conversión de progesterona a andrógenos (Smitz et al. 2007).

Finalmente, las diferentes isoformas que puede adoptar la molécula de FSH y que varía en los preparados gonadotrópicos disponibles comercialmente también pueden influir sobre la calidad embrionaria y los resultados de un ciclo de FIV. Las

isoformas de la FSH se caracterizan por tener un punto isoeléctrico (pI) determinado que depende de la presencia de cargas negativas de ácido siálico, de modo que las formas más acídicas tienen más residuos de siálico y pI más bajos (Yding Andersen 2002). En la circulación, la composición en isoformas de la FSH exhibe fluctuaciones características en la fase folicular con prevalencia de formas más acídicas al inicio de la misma y que cambian gradualmente a una mezcla menos ácida conforme se aproxima la ovulación. La concentración de estradiol parece actuar como el principal regulador de esta mezcla de isoformas liberadas desde la hipófisis de modo que niveles elevados de estradiol inducen la liberación de formas poco acídicas y viceversa. Las isoformas menos acídicas son más efectivas a la hora de estimular la síntesis y secreción de estrógenos mientras que las isoformas más cargadas de siálico favorecen la expresión de subunidades de inhibina.

Cuando se considera la influencia de las isoformas de la FSH sobre el desarrollo folicular y posterior desarrollo embrionario, se observa que las formas con menos carga de residuos acídicos promueven un crecimiento folicular más rápido incluso con dosis de FSH más bajas que si se emplean formas más ácidas (Nayudu et al. 2002). La exposición folicular a isoformas básicas de FSH deriva en más de un 80% de embriones en 2-células; el crecimiento y desarrollo folicular depende probablemente de la exposición específica y durante un tiempo determinado a una mezcla de isoformas de FSH de baja carga negativa y que induce la maduración ovocitaria. Las preparaciones con FSH recombinante contienen mayor proporción de isoformas no acídicas mientras que la FSH urinaria y la HMG tienen un perfil más ácido.

Resumiendo, el tipo de gonadotropina empleada puede influir sobre la tasa de desarrollo embrionario y los resultados finales del ciclo desde numerosas perspectivas, que engloban el posible efecto o no de la LH contenida en preparados gonadotrópicos como la HMG, las variaciones en el perfil endocrino dependiendo del tipo de gonadotropina empleada y la influencia de las isoformas de la FSH sobre un tratamiento de reproducción asistida, por lo que resulta complicado extraer conclusiones definitivas sobre el beneficio de un tipo de tratamiento en concreto.

Los ensayos que prueban la equivalencia de los preparados gonadotrópicos han alimentado la polémica acerca de las diferencias en cuanto a la eficacia de la estimulación ovárica controlada. La cuestión se centra en explicar si el uso de fármacos con actividad LH ofrece algún tipo de ventajas a las parejas en tratamiento de fertilidad, ya que desde un punto de vista clínico, la decisión sobre qué gonadotropina prescribir no resulta fácil. Los resultados de este estudio, tampoco permiten afirmar con cierto grado de seguridad si un preparado gonadotrópico es mejor que otro. Analizando con detalle los resultados de la cinética de desarrollo embrionario, no se observan diferencias significativas para ninguna de las variables de tiempo evaluadas, de modo que ni la FSH recombinante (de perfil poco ácido y con ventajas desde el punto de vista de la maduración ovocitaria y la intensidad de la respuesta ovárica), ni la LH (con su hipotético beneficio sobre la calidad embrionaria y los procesos de selección folicular), ejercen un efecto real sobre la cinética de desarrollo embrionario, por lo que se puede asumir, que en un programa de donación de ovocitos, donde el punto de partida son ciclos de buen pronóstico, se puede prescribir cualquiera de los preparados gonadotrópicos disponibles comercialmente.

Una vez establecida la bondad de los preparados gonadotrópicos sobre la cinética de desarrollo embrionario, el siguiente paso fue observar si la ausencia de diferencias entre tipos de gonadotropinas se correlacionaba con el porcentaje de embriones definidos como óptimos en cada una de las variables consideradas anteriormente (Meseguer et al. 2011) y con su distribución en cada una de las categorías morfocinéticas del algoritmo empleado en los procesos de selección embrionaria.

El objetivo principal de los protocolos de estimulación es obtener una cohorte embrionaria de buena calidad. Además, a lo largo del trabajo, se ha comentado en varias ocasiones la subjetividad de los marcadores clásicos de calidad embrionaria, y en concreto, de los aspectos relacionados con las evaluaciones morfológicas así como la ventaja que supone la introducción de nuevos parámetros más fiables y no invasivos en el contexto de los criterios de selección embrionaria. Actualmente, la mayoría de trabajos relacionados con el estudio de la influencia del tipo de gonadotropinas se

limitan a describir las diferencias morfológicas entre ovocitos y/o embriones en función de si se ha utilizado FSH recombinante y/o HMG en la estimulación ovárica.

En lo que respecta a este trabajo, los embriones catalogados como óptimos no sólo incluyen unas características morfológicas determinadas sino también unos rangos de división embrionaria muy concretos que aumentan sus posibilidades de implantación. En línea con los resultados cinéticos obtenidos, tampoco se observan diferencias relevantes en la proporción de embriones óptimos para cada una de las variables de tiempo con mayor potencial predictivo de las posibilidades de implantación. A pesar de que se describe una tendencia a favor de la FSH recombinante tanto en T5, como en CC2 y S2, ésta no se traduce claramente en la obtención de una cohorte embrionaria de mayor calidad y con mayores posibilidades de implantación. Como se sabe, la calidad del gameto determina la futura calidad embrionaria; el hecho de que la cantidad de embriones óptimos sea similar en todos los grupos de estudio, independientemente del tipo de gonadotropina empleado, permite afrontar con cierto grado de confianza los tratamientos futuros al saber que se mejoran igualmente los resultados del ciclo con el empleo de una u otra combinación de gonadotropinas.

Relativo a la distribución embrionaria en las categorías del algoritmo, los resultados no difieren de los que se ha comentado anteriormente. Cuando se examinan los porcentajes embrionarios en relación a los criterios de exclusión (multinucleación, simetría y divisiones abruptas), se describe la misma tendencia a favor del grupo estimulado únicamente con FSH recombinante que se había observado con respecto a los rangos óptimos de tiempo; a pesar de que no se alcanzan diferencias significativas, la proporción de embriones de clase E es menor en los ciclos estimulados sólo con FSH recombinante. Estos resultados se continúan con el resto de categorías analizadas, de modo que cuando se combinan criterios morfológicos con criterios cinéticos, se percibe que en aquellos ciclos estimulados con FSH recombinante, la presencia de embriones de buena calidad morfológica y cronológica es mayor, aunque esta tendencia positiva no se ve respaldada por el significado estadístico.

En conjunto, a pesar de las diferencias descritas en función de las características estructurales de las gonadotropinas empleadas en los protocolos de

estimulación, y a que se describe cierta tendencia favorable a la FSH recombinante en las variables analizadas, no es posible destacar los beneficios de un tipo de gonadotropina sobre otro en los protocolos de estimulación de los programas de donación de ovocitos, puesto que no se detectan diferencias relevantes ni en cinética ni en calidad embrionaria.

El nacimiento de un niño es el éxito más relevante de un tratamiento de reproducción asistida. Desafortunadamente, la gran mayoría de embriones producidos *in vitro* y transferidos durante un ciclo no alcanzan este objetivo, por lo que los esfuerzos se centran en mejorar la eficacia de los tratamientos frente a la infertilidad y aumentar las probabilidades de éxito. Un área de optimización potencial ha sido el examen de diferentes preparados gonadotrópicos; en 2003 se publicó un meta-análisis (Van Wely et al., 2003) en el que se demostró que la HMG no es inferior a la FSH recombinante en términos de gestación y nacidos vivos; este trabajo señaló que, aunque existe una tendencia positiva a favor de la HMG, el incremento no es significativo desde un punto de vista estadístico. Los estudios posteriores que comparaban la equivalencia de los dos preparados gonadotrópicos han alimentado el debate en relación a sus diferencias en cuestiones como la estimulación ovárica, lo que ha permitido que se continúe investigando para llegar a la conclusión de si el uso de fármacos con actividad LH (LH y/o hCG) ofrece alguna ventaja a las parejas en tratamiento de fertilidad. Los resultados obtenidos por Van Wely se reproducen en una amplia variedad de estudios (Drakakis et al. 2005, Humaidan et al. 2004) que muestran que en los ciclos estimulados con HMG se obtiene una cantidad significativamente mayor de ovocitos maduros, ovocitos fecundados y embriones potencialmente transferibles y cierta tendencia positiva en cuanto a tasas de gestación.

Los meta-análisis más recientes (Al-Inany et al. 2008, Coomarasamy et al. 2008) determinan que la administración de HMG aumenta de forma significativa las tasas de gestación y de nacidos vivos. Los meta-análisis suelen reflejar una serie de aspectos clínicos y de características de las pacientes que pueden generalizarse a otras parejas; en estos trabajos, ninguno de los estudios incluidos mostraba diferencias significativas para cualquiera de los fármacos (HMG vs FSH recombinante), aunque la mayoría de trabajos mostraba una tendencia favorable a la HMG. Sin embargo, estos

resultados deben interpretarse con cautela ya que la heterogeneidad clínica en el tipo y grado de purificación de la HMG, los protocolos de desensibilización hipofisaria, la proporción de ciclos de FIV-ICSI y las características basales de las pacientes (edad, tipo de infertilidad, ...) permiten por un lado, la posibilidad de generalizar los resultados obtenidos y por otro, reforzar las diferencias entre los estudios incluidos en el propio meta-análisis (Higgins and Green 2008).

Los resultados reproductivos obtenidos en este trabajo coinciden con los estudios comentados previamente, ya que se observa una tendencia a favor de la HMG tanto en las tasas de implantación como en las tasas de gestación, aunque este beneficio no se traduce en diferencias estadísticamente significativas. Se sabe que la HMG, induce cambios en el perfil hormonal que derivan en una foliculogénesis diferencial y que estas diferencias en las concentraciones hormonales influyen sobre la calidad del ovocito y del embrión resultante. Los cambios hormonales dependientes del tipo de gonadotropina utilizada conducen a que en los protocolos sólo con HMG se recluten menos folículos y en consecuencia, se recuperen menos ovocitos; además, la actividad LH en la fase folicular está relacionada con una mejoría de la calidad embrionaria, ya que a pesar de que se obtienen menos ovocitos en los ciclos con HMG, la proporción de embriones de buena calidad es mayor. Todas estas consideraciones explicarían los mejores resultados gestacionales obtenidos con la HMG, ya que la desigualdad relacionada con el número de ovocitos se corrige con la obtención de embriones de mejor calidad.

Es posible concluir que el tipo de gonadotropina no afecta de forma significativa a la cinética de desarrollo embrionario. Sin embargo, cuando se combinan criterios morfológicos y cinéticos se observa una tendencia que favorece a la FSH recombinante que no se refleja en los posteriores datos de gestación e implantación.

En el momento de la transferencia embrionaria, la selección de los embriones se realiza teniendo en cuenta únicamente criterios morfológicos; en este punto, los resultados reproductivos favorecen a la HMG, por lo que se asumiría que la FSH recombinante muestra una tendencia favorable a aumentar las proporciones de embriones cuyos parámetros morfocinéticos refuerzan su potencial de implantación,

mientras que la HMG beneficia claramente el aspecto morfológico del embrión, condición que determina la selección por parte del embriólogo.

Sin embargo, el hecho de que se trate de un estudio retrospectivo y la ausencia de diferencias significativas, indica que con los datos actuales no es posible probar que la LH presente en los preparados gonadotrópicos se asocie a una mejora significativa de los resultados de un ciclo de reproducción asistida, cuando se la compara con monoterapias con FSH recombinante.

En el momento de diseñar un protocolo de estimulación ovárica, el objetivo es conseguir un equilibrio razonable entre dos resultados opuestos entre sí: por un lado, se pretende obtener el mayor número de ovocitos maduros al mismo tiempo que se intenta reducir al mínimo el riesgo de sufrir un síndrome de hiperestimulación ovárica. El reclutamiento y desarrollo multifolicular en respuesta a la estimulación con gonadotropinas son los principales factores que determinan el éxito de un ciclo en un programa de donación de ovocitos. Una baja respuesta ovárica desemboca en la cancelación del ciclo antes de la punción y/o en un riesgo considerable de no contar con una cantidad suficiente de embriones de buena calidad en el momento de la transferencia.

En un programa de donación de ovocitos, la posibilidad de predecir la respuesta ovárica antes de comenzar con el protocolo de estimulación resulta útil a la hora de seleccionar a las donantes y ayuda a personalizar las **dosis de gonadotropinas** de forma individual. En este grupo de mujeres fértiles y con una buena reserva ovárica, los métodos de determinación hormonal tienen un valor limitado por lo que en un esfuerzo por encontrar factores pronóstico que mejoren la selección de las donantes con determinaciones basales endocrinas normales comienza a valorarse el estudio del tamaño de la cohorte de folículos antrales (AFC), el cual es un método barato, fácil y reproducible que ayuda a estimar la respuesta ovárica a las gonadotropinas en un determinado ciclo (Melo et al. 2009b). Por lo tanto, el recuento de folículos antrales de la donante va a determinar las dosis de gonadotropinas exógenas del protocolo de estimulación.

Durante el tratamiento con gonadotropinas en un ciclo estimulado, las células individuales del folículo ovárico responden a las gonadotropinas administradas secretando diferentes hormonas, factores de crecimiento y citoquinas; de estas sustancias,

algunas influyen, directa o indirectamente en la viabilidad del ovocito y en su posterior potencial de desarrollo. Las hormonas ováricas desempeñan un papel clave a la hora de facilitar el proceso reproductivo. Aunque los ovarios producen varios tipos de hormonas, la síntesis cíclica y cronológica de estradiol (E2) y progesterona (P4) se considera un factor esencial en la regulación del proceso reproductivo desde el desarrollo folicular hasta los fenómenos posteriores de fecundación, evolución embrionaria e implantación. Teniendo en cuenta sus mecanismos clásicos de acción, se plantea la idea de la unión del estradiol a su receptor para desencadenar la síntesis de un conjunto de factores paracrinós y autocrinos que facilitan el desarrollo del ovocito, la fecundación y el desarrollo embrionario. Aunque su influencia sobre la fertilidad femenina está perfectamente definida, su significado exacto sobre los resultados de un ciclo de fecundación *in vitro* es incierto. Las hormonas esteroideas incluyen un amplio grupo de moléculas derivadas del colesterol; los estrógenos y la progesterona representan a las hormonas clave implicadas en los procesos de maduración ovocitaria y receptividad endometrial, dos factores estrechamente relacionados con el resultado del ciclo.

Como ya se ha comentado previamente, el reclutamiento y desarrollo multifolicular en respuesta a la estimulación con gonadotropinas son los principales factores que determinan el éxito de un ciclo en un programa de donación de ovocitos, de modo que una situación de baja respuesta ovárica puede desembocar en la cancelación del ciclo y/o en la posibilidad de no contar con embriones suficientes de buena calidad en el momento de la transferencia, de ahí la importancia del recuento de folículos antrales previo al inicio de la estimulación con gonadotropinas para optimizar los resultados del ciclo.

Los resultados muestran diferencias significativas en los tiempos de división embrionaria en función de la dosis de gonadotropinas administrada. Teniendo en cuenta que los embriones que se dividen antes muestran mejores perspectivas de desarrollo (Sakkas et al. 1998), se describe un rango óptimo de dosis de gonadotropinas, en este caso de FSH recombinante, que influye positivamente sobre la cinética de desarrollo embrionario. En este momento se sugiere una influencia real de la cantidad de gonadotropinas administradas, lo que refuerza la evaluación de la reserva ovárica de la donante con el propósito de diseñar un protocolo de estimulación que se ajuste al máximo

al objetivo original: la recuperación de la mayor cantidad posible de ovocitos maduros con el propósito de maximizar las interacciones entre los gametos y aumentar las probabilidades de gestación. Los ciclos de las donantes de ovocitos suelen ser de buen pronóstico, de modo que teóricamente, contarán con una buena dotación de folículos antrales; este hecho, implica el uso de menos dosis de gonadotropinas para estimular al ovario, por lo que los ovocitos no se verán tan perjudicados por el uso de una estimulación agresiva, de ahí que el intervalo con menos dosis de FSH recombinante incluya a los embriones de mejor comportamiento cinético.

Mejorar la calidad de la cohorte ovocitaria se refleja en la calidad de la cohorte embrionaria; en este caso, los embriones derivados de ciclos estimulados dentro de este intervalo recomendable de dosis de gonadotropinas se caracterizan por presentar unos tiempos de división cuyos valores se encuentran dentro de los límites que definen a un embrión óptimo desde el punto de vista cinético. Esta correlación de hechos culmina con la obtención de una cohorte embrionaria con mayores posibilidades de implantación.

Durante el desarrollo de un protocolo de estimulación, las concentraciones intrafoliculares de FSH y LH reflejan el impacto local de la administración de gonadotropinas después de desensibilizar la hipófisis con agonistas de la GnRH así como el grado e intensidad de esta supresión. Una consecuencia del reclutamiento multifolicular es que no sólo se ven afectados los niveles de gonadotropinas en las distintas fases del ciclo, sino también las concentraciones de **hormonas esteroideas** derivadas de la acción sinérgica de la FSH y la LH; se observan niveles suprafisiológicos de estradiol y progesterona cuyo impacto sobre la calidad del ciclo continúa siendo objeto de un intenso debate.

La relación entre tamaño folicular y maduración ovocitaria es imprecisa. Eppig (Eppig et al. 1992) pensaba que la capacidad de desarrollo del ovocito -definida como la posibilidad de fecundar y llegar a blastocisto- era independiente del tamaño del folículo y del ovocito. Sin embargo, el ovocito humano tiene una capacidad para reanudar la meiosis y madurar dependiente del tamaño: a mayor tamaño del folículo/ovocito, mejor tasa de maduración ((Whitacre et al., 1998). Además, ya se había demostrado que la capacidad de síntesis hormonal de las células de la granulosa depende también del tamaño del folículo del que proceden, principalmente en lo que a actividad aromatasa se

refiere (McNatty et al. 1979). Tomando como punto de partida estas afirmaciones, se postula que a mayor tamaño del folículo, mayor concentración esteroidea.

En lo que respecta a la concentración suprafisiológica de estradiol, algunos autores no detectan efectos adversos (Chenette et al. 1990), mientras que otros investigadores indican descensos evidentes en tasas de fecundación, gestación e implantación (Pellicer et al. 1989a). El estradiol afecta tanto al endometrio como a la calidad del ovocito y el embrión, por lo que el análisis de cómo varían sus concentraciones a lo largo del ciclo de estimulación resulta difícil de interpretar con gametos propios lo que explica la importancia del modelo de donación en el que la receptividad endometrial está dissociada de la folículogénesis de la donante. Los ovocitos (y embriones) procedentes de donantes jóvenes tienen un potencial de desarrollo superior en comparación con las parejas infértiles en un tratamiento de reproducción; la mejoría en las tasas de implantación derivadas de los programas de donación son el resultado de un medio hormonal más fisiológico que desliga la receptividad del endometrio de la producción ovocitaria por lo que la separación del efecto del aumento del estradiol según consideremos fase folicular o fase lútea, permite el estudio de cómo afectan las concentraciones excesivas de estradiol a la calidad ovocitaria, y en consecuencia, al desarrollo embrionario.

Los resultados coinciden con los de otros autores (Manno et al. 2011, Papageorgiou et al. 2002, Pena et al., 2002) a la hora de concluir que los niveles altos de estradiol no afectan a la calidad del desarrollo embrionario; las elevadas concentraciones intrafoliculares de estradiol son consecuencia directa de las altas concentraciones de LH, las cuales promueven la esteroidogénesis en las células de la teca y en las células de la granulosa. Sin embargo, también reflejan un elevado número de folículos dominantes que derivan en una mayor proporción de ovocitos maduros y que van a permitir rentabilizar el proceso de selección embrionaria. Es decir, si las cantidades de gonadotropinas se prescriben en función de la reserva ovárica de la donante y ésto desemboca en la definición de un rango óptimo de dosis, resulta lógico esperar que esta optimización del tratamiento se prolongue en la descripción de unas concentraciones de estradiol en las que el desarrollo embrionario también se vea beneficiado.

En este caso, se observa que el intervalo que incluye las concentraciones de estradiol más altas, también engloba a los embriones con mejor cronología del desarrollo. Aunque no hay que olvidar que se ha trabajado con un modelo de donación de ovocitos e hipotéticamente con mujeres de buen pronóstico reproductivo, precisar al máximo la estimulación ovárica de la donante supone obtener una cohorte embrionaria con mayor potencial de desarrollo e implantación. Previamente, se había resaltado la influencia real de las dosis de gonadotropinas sobre los tiempos de división embrionaria, de modo que determinadas cantidades de FSH recombinante son claramente mejores que otras a la hora de considerar el desarrollo embrionario desde un punto de vista dinámico; pues bien, estas dosis de gonadotropinas y teniendo en cuenta la relación proporcional entre tamaño folicular y síntesis de estradiol, conducen a un reclutamiento y desarrollo multifolicular que también se manifiesta en una concentraciones de estradiol capaces de optimizar el desarrollo embrionario.

Se observa una clara asociación entre el estradiol y la cinética embrionaria de modo que a mayor concentración hormonal mayor rapidez en las sucesivas divisiones embrionarias. Esta relación muestra diferencias significativas en una amplia proporción de las variables estudiadas; sin embargo, y al igual que ocurría con las dosis de FSH recombinante, también se encuentran diferencias relevantes en el tiempo necesario para alcanzar el estadio de blastocisto, lo cual indica que la tendencia que se venía arrastrando en todos los tiempo de división se magnifica en esta estructura embrionaria. Como se sabe, el hecho de que un embrión llegue a blastocisto supone una selección natural dentro de la propia cohorte embrionaria; con el blastocisto, no sólo “se filtran” a los mejores embriones, sino que también se aumentan las posibilidades de gestación e implantación (Gardner et al. 2002). Se demuestra la importancia del clínico a la hora de diseñar un protocolo de estimulación y se pone de manifiesto la relevancia de los patrones cinéticos del desarrollo a la hora de determinar la calidad de la cohorte embrionaria; la concentración de estradiol condiciona el perfil cronológico del desarrollo no sólo en las primeras divisiones, las cuales son más sensibles a la influencia de perturbaciones externas, sino también en la cinética de desarrollo a blastocisto, considerado como uno de los marcadores más importantes de calidad embrionaria.

En lo que respecta a la progesterona, desde la introducción de los agonistas de la GnRH para evitar los picos prematuros de LH, se abre un debate relacionado con los orígenes y la importancia clínica de la progesterona en la circulación periférica al final de la fase folicular de una estimulación ovárica controlada. Ubaldi (Ubaldi et al. 1996) localiza el origen de esta elevación en la actividad de las células de la granulosa de los folículos en crecimiento y que no están luteinizadas puesto que se ha eliminado el pico de LH. Esta observación plantea la hipótesis de cómo pudo haber surgido este fenómeno y resalta su importancia clínica; el ascenso en las concentraciones periféricas de progesterona al final de la fase folicular influyen sobre el desarrollo endometrial, mientras que apenas tienen importancia en el desarrollo del ovocito y del embrión.

Un ovario con muchos folículos en crecimiento, y sostenido por la administración de dosis diarias de FSH recombinante, producirá y secretará más progesterona que un sólo folículo en presencia de concentraciones decrecientes de la gonadotropina. De acuerdo al desarrollo folicular obtenido durante el periodo de estimulación, la síntesis de progesterona se amplifica como consecuencia de la cantidad de folículos reclutados y de la presencia de FSH; este hecho impacta sobre las concentraciones de progesterona e influye sobre el desarrollo endometrial. Los tres principales componentes que determinan el grado de secreción ovárica de progesterona son (Fleming and Jenkins 2010)

- número de folículos (o de células de la granulosa).
- intensidad del estímulo trófico (FSH que actúa sobre las células de la granulosa)
- señal de la LH sobre las células de la teca que convierte a la progesterona en andrógenos y estrógenos.

Aunque este aumento “pre-hCG” ha sido definido como una luteinización prematura, el término es incorrecto puesto que el pico de progesterona ocurre en presencia del agonista de la GnRH, es decir, con niveles mínimos de LH. Más que cantidades excesivas de progesterona producida por las células de la granulosa como consecuencia de una luteinización precoz, los niveles elevados de la hormona pueden atribuirse a un exceso de folículos, cada uno de los cuales sintetiza progesterona. Esta idea se confirma con un estudio posterior de Bosch (Bosch et al. 2010) que demuestra que no existe ninguna relación entre LH y progesterona al final de la fase folicular, ya que los aumentos hormonales no se corresponden con un aumento de la gonadotropinas

por lo que se concluye que el ambiente hipergestagénico refleja la respuesta de las células de la granulosa maduras a la exposición a la FSH.

En cuanto a la influencia de las dosis de progesterona sobre la velocidad del desarrollo embrionario, los resultados muestran diferencias significativas principalmente en las primeras divisiones celulares. Sin embargo, no es posible establecer una correlación entre un rango de concentraciones de progesterona y un patrón uniforme de desarrollo embrionario, puesto que los embriones con divisiones significativamente más tempranas corresponden tanto a las máximas ($P4 \geq 1.11$ ng/ml) como a las mínimas ($P4 \leq 0.5$ ng/ml) concentraciones, lo cual resulta contradictorio.

Una vez que hemos determinado la influencia de las concentraciones de hormonas esteroideas sobre la velocidad de desarrollo embrionario, la siguiente pregunta que se plantea es: ¿cuales son los mecanismos por los que las hormonas esteroideas pueden influir sobre la calidad del ovocito y del embrión?

El significado de los niveles de hormonas esteroideas durante un tratamiento de estimulación ovárica es controvertido debido a su importancia para el éxito del desarrollo folicular y la maduración ovocitaria. La necesidad de un medio intrafolicular con concentraciones específicas de esteroides que permitan la reanudación de la meiosis y que se complete el proceso de maduración se ha demostrado en ovocitos de cerdo (Ainsworth et al. 1980). En humanos, Tesarik y Mendoza revelan que el 17β -estradiol es beneficioso para la maduración del citoplasma en estadio de vesícula germinal, lo cual se caracteriza por un aumento en las concentraciones de calcio libre (Tesarik and Mendoza 1995); este estudio concluye que el estradiol influye sobre la maduración *in vitro* del citoplasma actuando en la superficie celular y culminando con mejores tasas de fecundación y división en un ciclo de fecundación *in vitro*. Sin embargo, aunque se demuestra el efecto beneficioso de los estrógenos en la maduración del citoplasma de ovocitos humanos, hay otros estudios que sugieren que su presencia no es estrictamente necesaria en la producción y crecimiento de ovocitos capaces de madurar y de sostener el desarrollo embrionario durante la maduración *in vitro* y en folículos de ratón (Huynh et al. 2004).

La presencia de diferencias significativas en algunas de las variables de tiempo analizadas tanto para la dosis de gonadotropinas como para la concentración de estradiol,

no se traduce en un aumento de la proporción de embriones con un mayor potencial de implantación. En el caso de las dosis de FSH, los embriones con mejor comportamiento cinético son aquéllos que derivan de ciclos estimulados con dosis mínimas de gonadotropinas; estos resultados, se ven reflejados posteriormente en la proporción de embriones óptimos en cada una de las variables consideradas como de elevado poder predictivo en cuanto a potencial de implantación. Es decir, aunque no se describen diferencias significativas, la cantidad de embriones óptimos para cada una de las variables es mayor en el grupo que contiene menos dosis de gonadotropinas; similares resultados se obtienen con las categorías del algoritmo, donde se vuelve a reflejar esta correlación. El hecho de trabajar con un programa de donación de ovocitos, implica partir de ciclos *a priori* de buen pronóstico, de contar con donantes con una adecuada cantidad de folículos antrales, de modo que para obtener un buen rendimiento ovocitario no es preciso estimular de forma agresiva el ovario y este mínimo impacto se ve reflejado en la obtención de embriones cuyas características morfocinéticas predicen un mayor potencial evolutivo. Sin embargo, la ausencia de variaciones relevantes no permite asegurar que con dosis mínimas de gonadotropinas mejore significativamente la calidad de la cohorte embrionaria con respecto al resto de dosis examinadas.

En el caso del estradiol, las diferencias significativas en la cinética de desarrollo embrionario sí encuentran su correspondiente equivalencia en la proporción de embriones óptimos para las variables T5 y CC2. Se obtienen los mejores resultados cinéticos para las concentraciones de estradiol superiores a los 2000 pg/ml; posteriormente, se observa que la proporción de embriones incluidos en los rangos óptimos de tiempo son significativamente mayores con estas concentraciones de estradiol, lo que indica que esta hormona esteroidea, no solo ejerce una influencia real en la velocidad de desarrollo sino que también mejora las características morfocinéticas de los embriones que se traduce en un aumento real del potencial de implantación. Como se ha comentado previamente, los niveles de estradiol dependen del tamaño folicular y están implicados en los procesos de maduración ovocitaria y además, se sabe que con menores dosis de FSH recombinante existe cierta tendencia a mejorar la calidad de la cohorte. La buena dotación folicular de la donante implica una estimulación menos agresiva que sin embargo deriva en unas

concentraciones de estradiol que mejoran significativamente la calidad de la cohorte embrionaria, y en consecuencia, las probabilidades de gestación de la paciente.

Los resultados clínicos corroboran los datos del laboratorio. Tanto para las dosis de FSH como para las concentraciones de estradiol, las tasas de gestación son mejores (aunque no se alcanzan diferencias significativas) en los intervalos donde previamente se había observado un mejor comportamiento cinético (embriones ligeramente más rápidos) y mayor potencial de implantación. Con todo esto, vuelve a ponerse de manifiesto la importancia del clínico a la hora de diseñar un protocolo específico de estimulación en función de las características individuales de cada paciente; el beneficio derivado de estimular a la donante con una dosis de gonadotropinas ajustadas a su dotación folicular deriva en unas concentraciones suprafisiológicas de estradiol, que a través de su papel en los procesos de maduración ovocitaria, mejora la calidad embrionaria, tanto morfológica como cinética.

Las proporciones de embriones óptimos para los rangos de progesterona pueden considerarse como una continuación de los resultados cinéticos, en los que no es posible describir una concentración de progesterona que favorezca la presencia de embriones óptimos para cada una de las variables de tiempo analizadas. A pesar de lo comentado anteriormente, no es posible asegurar que una concentración elevada de progesterona favorezca los procesos de maduración ovocitaria y en consecuencia la competencia embrionaria y que unos niveles escasos disminuyan el porcentaje de ovocitos que reinician la meiosis, debido a que la fracción de embriones óptimos es muy parecida en ambos extremos de las concentraciones de progesterona. Si la calidad del embrión se refleja en las probabilidades de gestación, los resultados refuerzan la línea argumental que se había expuesto hasta el momento; la ausencia de diferencias significativas en las tasas de gestación en función de las concentraciones de progesterona indica la poca importancia de la progesterona de la hormona a la hora de definir la calidad embrionaria.

Resumiendo, fijar las dosis de gonadotropinas al inicio de la estimulación ovárica resulta un paso esencial en la determinación de la calidad de la futura cohorte embrionaria. El hecho de que la cantidad de gonadotropinas influya de forma real sobre el patrón cronológico de desarrollo embrionario se traduce en un rango óptimo de dosis que a su vez se refleja en la obtención de un conjunto de embriones que se dividen dentro de

unos márgenes muy concretos de tiempo y que en ultima instancia, derivan en embriones con mayor potencial de desarrollo e implantación. Además, la relación entre dosis de gonadotropinas y síntesis de hormonas esteroideas, conduce a la definición de unos niveles altamente recomendables de estradiol, en los cuales se describe una cinética de desarrollo embrionario con mejores perspectivas de competencia que en el resto de intervalos de concentraciones hormonales y que alcanzan su máxima expresión con la aparición de diferencias significativas en el tiempo que necesita el embrión para desarrollarse a blastocisto, el cual está considerado como uno de los principales marcadores de calidad embrionaria.

CONCLUSIONES

La estimulación ovárica se ha convertido en un componente clave de las técnicas de Reproducción Asistida. Sin embargo, a pesar de los avances evidentes que se han logrado en este campo, las tasas de gestación no superan el 20-30% por ciclo iniciado. Con el objetivo de compensar la baja eficacia de los procedimientos de fecundación *in vitro*, se administran elevadas dosis de gonadotropinas exógenas para estimular la maduración de múltiples ovocitos en un único ciclo. No obstante en los últimos años, ha quedado patente que la estimulación ovárica, aunque un componente central de los ciclos de FIV, puede a su vez afectar negativamente a la ovogénesis, calidad embrionaria, receptividad endometrial y probablemente a los resultados perinatales.

A pesar de la experiencia acumulada y de la gran cantidad de datos derivados de su aplicación, los criterios morfológicos actuales de selección embrionaria están sujetos a la opinión subjetiva del embriólogo, por lo que sólo *a posteriori* se puede inferir con precisión la calidad de un embrión, es decir, si el embrión transferido ha culminado en una gestación. De ahí la importancia en la búsqueda de nuevos marcadores de selección embrionaria que aporten un mayor grado de objetividad a los criterios de selección.

Ante estas perspectivas, el objetivo de nuestro trabajo se centró en determinar la posible influencia de los protocolos de estimulación ovárica sobre la cinética de desarrollo embrionario, en ciclos de donación de ovocitos. Se estudia el efecto de los protocolos de estimulación ovárica desde diferentes ángulos tales como el tipo de análogo de la GnRH empleado para la desensibilización hipofisaria, el agente inductor de la ovulación, el tipo y dosis de gonadotropinas y las concentraciones de hormonas esteroideas el día de la inducción de la ovulación, y se concluye que :

1.- el tipo de análogo de la GnRH (agonistas y/o antagonistas) empleado en los protocolos de estimulación ovárica influyen significativamente sobre la cinética de desarrollo embrionario. Los cigotos derivados de ciclos estimulados con antagonistas de la GnRH comienzan a dividirse antes que los embriones procedentes de ciclos estimulados con agonistas de la GnRH. Sin embargo, estas diferencias cinéticas que sí son significativas desde un punto de vista estadístico no se traducen en una mejora evidente de la calidad embrionaria ni de los resultados clínicos.

2.- el empleo de hCG o de agonistas de la GnRH como agentes de inducción de la ovulación suponen la aparición de diferencias significativas en la velocidad de desarrollo

embrionario. Al igual que ocurría con el tipo de análogo de la GnRH, el impacto biológico no se corresponde con una mejora evidente de la calidad embrionaria ni de los resultados gestacionales.

3.- en cuanto a las posibles diferencias introducidas por los diferentes preparados gonadotrópicos disponibles comercialmente no se obtienen variaciones significativas para ninguna de las opciones estudiadas, ni en términos cinéticos, de competencias embrionarias y/o relacionadas con las tasas de gestación e implantación.

4.- las dosis de gonadotropinas (FSH recombinante) empleadas en la estimulación ovárica afectan significativamente a la cinética de desarrollo embrionario. El uso de dosis mínimas de gonadotropinas, lo cual implica una estimulación ovárica poco agresiva, se refleja en un inicio temprano de las divisiones embrionarias. El hecho de trabajar con donantes de ovocitos y en consecuencia con ciclos de buen pronóstico implica una buena dotación inicial de folículos antrales lo que conduce a una estimulación menos agresiva y a la obtención de ovocitos de mejor calidad que se traduce en un mejor comportamiento cinético de los embriones. Sin embargo, no se describe una asociación equivalente en cuanto a calidad embrionaria y resultados clínicos.

5.- por último, se observa un impacto significativo de la concentración de hormonas esteroideas, tanto de estradiol como de progesterona, sobre la cinética de desarrollo embrionario el día de inducción de la ovulación. En el caso del estradiol, conforme aumenta la presencia de la hormona más rápidas son las sucesivas divisiones embrionarias lo que pone de manifiesto la importancia del perfil hormonal sobre la calidad ovocitaria y del futuro embrión; por su parte, la progesterona también afecta de manera significativa a la cinética embrionaria pero en este caso, no es posible describir un intervalo óptimo de concentraciones hormonales que describan un patrón uniforme de desarrollo embrionario. Al igual que en los casos anteriores, las diferencias cinéticas no se traducen en una mejora evidente de la calidad embrionaria ni en un aumento significativo de las tasas de gestación e implantación.

BIBLIOGRAFÍA

Ainsworth L, Tsang BK, Downey BR, Marcus GJ and Armstrong DT. Interrelationships between follicular fluid steroid levels, gonadotropic stimuli, and oocyte maturation during preovulatory development of porcine follicles. *Biol Reprod* 1980;**23**:621-627.

Albano C, Smits J, Camus M, Riethmuller-Winzen H, Van Steirteghem A and Devroey P. Comparison of different doses of gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 1997;**67**:917-922.

Al-Inany HG, Abou-Setta AM, Aboulghar MA, Mansour RT and Serour GI. Efficacy and safety of human menopausal gonadotrophins versus recombinant FSH: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2008;**16**:81-88.

Alviggi C, Clarizia R, Mollo A, Ranieri A and De Placido G. Outlook: who needs LH in ovarian stimulation?. *Reprod Biomed Online* 2006;**12**:599-607.

Andersen AN. Accumulating evidence for improved outcomes using hMG versus rFSH preparations in assisted reproductive technology cycles. *Touch Briefings* 2008:24-26.

Andersen CY, Humaidan P, Ejdrup HB, Bungum L, Grondahl ML and Westergaard LG. Hormonal characteristics of follicular fluid from women receiving either GnRH agonist or hCG for ovulation induction. *Hum Reprod* 2006;**21**:2126-2130.

Antman AM, Politch JA and Ginsburg ES. Conversion of high-response gonadotropin intrauterine insemination cycles to in vitro fertilization results in excellent ongoing pregnancy rates. *Fertil Steril* 2002;**77**:715-720.

Arav A, Aroyo A, Yavin S and Roth Z. Prediction of embryonic developmental competence by time-lapse observation and 'shortest-half' analysis. *Reprod Biomed Online* 2008;**17**:669-675.

Assou S, Boumela I, Haouzi D, Anahory T, Dechaud H, De Vos J and Hamamah S. Dynamic changes in gene expression during human early embryo development: from fundamental aspects to clinical applications. *Hum Reprod Update* 2011;**17**:272-290.

Balaban B and Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online* 2006;**12**:608-615.

Balasch J, Vidal E, Penarrubia J, Casamitjana R, Carmona F, Creus M, Fabregues F and Vanrell JA. Suppression of LH during ovarian stimulation: analysing threshold values and effects on ovarian response and the outcome of assisted reproduction in down-regulated women stimulated with recombinant FSH. *Hum Reprod* 2001;**16**:1636-1643.

Barbieri RL and Hornstein MD. Assisted reproduction-in vitro fertilization success is improved by ovarian stimulation with exogenous gonadotropins and pituitary suppression with gonadotropin-releasing hormone analogues. *Endocr Rev* 1999;**20**:249-252.

Baxter Bendus AE, Mayer JF, Shipley SK and Catherino WH. Interobserver and intraobserver variation in day 3 embryo grading. *Fertil Steril* 2006;**86**:1608-1615.

Beckers NG, Macklon NS, Eijkemans MJ, Ludwig M, Felberbaum RE, Diedrich K, Bustin S, Loumaye E and Fauser BC. Nonsupplemented luteal phase characteristics after the administration of recombinant human chorionic gonadotropin, recombinant luteinizing hormone, or gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist to induce final oocyte maturation in in vitro fertilization patients after ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone and GnRH antagonist cotreatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;**88**:4186-4192.

Bosch E, Pinilla L, Vargas G, Simon C, Pellicer A and Remohi J. Analysis of factors predicting bleeding during endometrial preparation with oestrogens for oocyte donation. *Fertil steril* 2001;**76**:S225.

Bosch E, Labarta E, Crespo J, Simon C, Remohi J, Jenkins J and Pellicer A. Circulating progesterone levels and ongoing pregnancy rates in controlled ovarian stimulation cycles for in vitro fertilization: analysis of over 4000 cycles. *Hum Reprod* 2010;**25**:2092-2100.

Botros L, Sakkas D and Seli E. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Mol Hum Reprod* 2008;**14**:679-690.

Bouchard P, Marraoui J, Massai MR, Medalie DA, De Ziegler D, Perrot-Applanat M, Frydman R and Bergeron C. Immunocytochemical localization of oestradiol and progesterone

receptors in human endometrium: a tool to assess endometrial maturation. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1991;**5**:107-115.

Brinsden P, Harsthorne G, Hirsh A and Owen E. Reproductive Medicine: from A to Z. 1998.

Brison DR, Hollywood K, Arnesen R and Goodacre R. Predicting human embryo viability: the road to non-invasive analysis of the secretome using metabolic footprinting. *Reprod Biomed Online* 2007;**15**:296-302.

Budak E, Garrido N, Soares SR, Melo MA, Meseguer M, Pellicer A and Remohi J. Improvements achieved in an oocyte donation program over a 10-year period: sequential increase in implantation and pregnancy rates and decrease in high-order multiple pregnancies. *Fertil Steril* 2007;**88**:342-349.

Chenette PE, Sauer MV and Paulson RJ. Very high serum estradiol levels are not detrimental to clinical outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1990;**54**:858-863.

Cole RJ. Cinemicrographic observations on the trophoblast and zona pellucida of the mouse blastocyst. *J Embryol Exp Morphol* 1967;**17**:481-490.

Conti M, Hsieh M, Park JY and Su YQ. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol* 2006;**20**:715-723.

Coomarasamy A, Afnan M, Cheema D, van der Veen F, Bossuyt PM and van Wely M. Urinary hMG versus recombinant FSH for controlled ovarian hyperstimulation following an agonist long down-regulation protocol in IVF or ICSI treatment: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008;**23**:310-315.

Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Gordon Baker HW, Behre HM, Haugen T, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT *et al.* World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reprod* 2009;**0**:1-15.

Cummins JM, Breen TM, Harrison KL, Shaw JM, Wilson LM and Hennessey JF. A formula for scoring human embryo growth rates in in vitro fertilization: its value in predicting

pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1986;**3**:284-295.

Devroey P, Boostanfar R, Koper N, Mannaerts B, Ijzerman-Boon P and Fauser B. ENGAGE Investigators. A double-blind, non-inferiority RCT comparing corifollitropin alfa and recombinant FSH during the first seven days of ovarian stimulation using a GnRH antagonist protocol. *Hum Reprod* 2009;**24**:3063-3072.

Ditkoff EC, Cassidenti DL, Paulson RJ, Sauer MV, Paul WL, Rivier J, Yen SS and Lobo RA. The gonadotropin-releasing hormone antagonist (Nal-Glu) acutely blocks the luteinizing hormone surge but allows for resumption of folliculogenesis in normal women. *Am J Obstet Gynecol* 1991;**165**:1811-1817.

Drakakis P, Loutradis D, Kallianidis K, Liapi A, Milingos S, Makrigiannakis A, Dionyssiou-Asteriou A and Michalas S. Small doses of LH activity are needed early in ovarian stimulation for better quality oocytes in IVF-ET. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;**121**:77-80.

Duijkers IJ, Klipping C, Willemsen WN, Krone D, Schneider E, Niebch G and Hermann R. Single and multiple dose pharmacokinetics and pharmacodynamics of the gonadotrophin-releasing hormone antagonist Cetorelix in healthy female volunteers. *Hum Reprod* 1998;**13**:2392-2398.

Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, Fehilly CB, Purdy JM, Slater JM, Steptoe PC and Webster JM. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1984;**1**:3-23.

Emons G, Ortmann O, Becker M, Irmer G, Springer B, Laun R, Holzel F, Schulz KD and Schally AV. High affinity binding and direct antiproliferative effects of LHRH analogues in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 1993;**53**:5439-5446.

Eppig JJ, Schroeder AC and O'Brien MJ. Developmental capacity of mouse oocytes matured in vitro: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. *J Reprod Fertil* 1992;**95**:119-127.

Escriba MJ, Bellver J, Bosch E, Sanchez M, Pellicer A and Remohi J. Delaying the initiation of progesterone supplementation until the day of fertilization does not compromise cycle outcome in patients receiving donated oocytes: a randomized study. *Fertil Steril* 2006;**86**:92-97.

Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ and Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod* 1992;**7**:1342-1346.

Fauser BC, de Jong D, Olivennes F, Wramsby H, Tay C, Itskovitz-Eldor J and van Hooren HG. Endocrine profiles after triggering of final oocyte maturation with GnRH agonist after cotreatment with the GnRH antagonist ganirelix during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;**87**:709-715.

Fauser BC, Laven JS, de Jong D and Macklon NS. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists: application in ovary-stimulating and sex-steroid dependent disorders. *Ned Tijdschr Geneeskde* 2000;**144**:370-374.

Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP and Herbert M. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod* 2002;**17**:407-412.

Filho ES, Noble JA and Wells D. A review on automatic analysis of human embryo microscope images. *Open Biomed Eng J* 2010;**4**:170-177.

Filicori M, Cognigni GE, Pocognoli P, Tabarelli C, Spettoli D, Taraborrelli S and Ciampaglia W. Modulation of folliculogenesis and steroidogenesis in women by graded menotrophin administration. *Hum Reprod* 2002;**17**:2009-2015.

Fleming R and Jenkins J. The source and implications of progesterone rise during the follicular phase of assisted reproduction cycles. *Reprod Biomed Online* 2010;**21**:446-449.

Garcia-Velasco JA, Isaza V, Vidal C, Landazabal A, Remohi J, Simon C and Pellicer A. Human ovarian steroid secretion in vivo: effects of GnRH agonist versus antagonist (cetrorelix). *Hum Reprod* 2001;**16**:2533-2539.

Gardner DK, Lane M and Schoolcraft WB. Physiology and culture of the human blastocyst. *J Reprod Immunol* 2002;**55**:85-100.

Garrido N, Bellver J, Remohi J, Simon C and Pellicer A. Cumulative live-birth rates per total number of embryos needed to reach newborn in consecutive in vitro fertilization (IVF) cycles: a new approach to measuring the likelihood of IVF success. *Fertil Steril* 2011:.

Giorgetti C, Hans E, Terriou P, Salzmann J, Barry B, Chabert-Orsini V, Chinchole JM, Franquebalme JP, Glowaczower E, Sitri MC *et al.* Early cleavage: an additional predictor of high implantation rate following elective single embryo transfer. *Reprod Biomed Online* 2007;**14**:85-91.

Gonen Y, Balakier H, Powell W and Casper RF. Use of gonadotropin-releasing hormone agonist to trigger follicular maturation for in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;**71**:918-922.

Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, Harrigan GG and Kell DB. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol* 2004;**22**:245-252.

Gorus FK and Pipeleers DG. A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. *Fertil Steril* 1981;**35**:662-665.

Hamamah S. Omics as a tool for ART]. *Gynecol Obstet Fertil* 2011;**39**:1-2.

Hamamah S, Matha V, Berthenet C, Anahory T, Loup V, Dechaud H, Hedon B, Fernandez A and Lamb N. Comparative protein expression profiling in human cumulus cells in relation to oocyte fertilization and ovarian stimulation protocol. *Reprod Biomed Online* 2006;**13**:807-814.

Hardarson T, Lofman C, Coull G, Sjogren A, Hamberger L and Edwards RG. Internalization of cellular fragments in a human embryo: time-lapse recordings. *Reprod Biomed Online* 2002;**5**:36-38.

Harris SJ, Milligan MP, Masson GM and Dennis KJ. Improved separation of motile sperm in asthenospermia and its application to artificial insemination homologous (AIH). *Fertil Steril* 1981;**36**:219-221.

Hayden C. GnRH analogues: applications in assisted reproductive techniques. *Eur J Endocrinol* 2008;**159 Suppl 1**:S17-25.

Herbert M, Gillespie JI and Murdoch AP. Development of calcium signalling mechanisms during maturation of human oocytes. *Mol Hum Reprod* 1997;**3**:965-973.

Higgins JPT and Green S. . *Cochrane Handbook for Systematic Reviews and Interventions 5.0.1* 2008:.

Hnida C, Engenheiro E and Ziebe S. Computer-controlled, multilevel, morphometric analysis of blastomere size as biomarker of fragmentation and multinuclearity in human embryos. *Hum Reprod* 2004;**19**:288-293.

Huirne JA and Lambalk CB. Gonadotropin-releasing-hormone-receptor antagonists. *Lancet* 2001;**358**:1793-1803.

Huirne JA, Lambalk CB, van Loenen AC, Schats R, Hompes PG, Fauser BC and Macklon NS. Contemporary pharmacological manipulation in assisted reproduction. *Drugs* 2004;**64**:297-322.

Humaidan P, Bredkjaer HE, Bungum L, Bungum M, Grondahl ML, Westergaard L and Andersen CY. GnRH agonist (buserelin) or hCG for ovulation induction in GnRH antagonist IVF/ICSI cycles: a prospective randomized study. *Hum Reprod* 2005;**20**:1213-1220.

Humaidan P, Bungum M, Bungum L and Yding Andersen C. Effects of recombinant LH supplementation in women undergoing assisted reproduction with GnRH agonist down-regulation and stimulation with recombinant FSH: an opening study. *Reprod Biomed Online* 2004;**8**:635-643.

Humaidan P, Ejdrup Bredkjaer H, Westergaard LG and Yding Andersen C. 1,500 IU human chorionic gonadotropin administered at oocyte retrieval rescues the luteal phase when

gonadotropin-releasing hormone agonist is used for ovulation induction: a prospective, randomized, controlled study. *Fertil Steril* 2010;**93**:847-854.

Humaidan P, Papanikolaou EG and Tarlatzis BC. GnRHa to trigger final oocyte maturation: a time to reconsider. *Hum Reprod* 2009;**24**:2389-2394.

Humaidan P, Westergaard LG, Mikkelsen AL, Fukuda M and Yding Andersen C. Levels of the epidermal growth factor-like peptide amphiregulin in follicular fluid reflect the mode of triggering ovulation: a comparison between gonadotrophin-releasing hormone agonist and urinary human chorionic gonadotrophin. *Fertil Steril* 2011;**95**:2034-2038.

Huynh K, Jones G, Thouas G, Britt KL, Simpson ER and Jones ME. Estrogen is not directly required for oocyte developmental competence. *Biol Reprod* 2004;**70**:1263-1269.

Imthurn B, Macas E, Rosselli M and Keller PJ. Nuclear maturity and oocyte morphology after stimulation with highly purified follicle stimulating hormone compared to human menopausal gonadotrophin. *Hum Reprod* 1996;**11**:2387-2391.

Inge GB, Brinsden PR and Elder KT. Oocyte number per live birth in IVF: were Steptoe and Edwards less wasteful?. *Hum Reprod* 2005;**20**:588-592.

Inoue S. Video Microscopy. 1986.

Inoue Y, Miyamoto S, Fukami T, Shirota K, Yotsumoto F and Kawarabayashi T. Amphiregulin is much more abundantly expressed than transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor in human follicular fluid obtained from patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 2009;**91**:1035-1041.

Itskovitz J, Boldes R, Levron J, Erlik Y, Kahana L and Brandes JM. Induction of preovulatory luteinizing hormone surge and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome by gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertil Steril* 1991;**56**:213-220.

Kamel RM. Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;**8**:21.

Klein J and Sauer MV. Oocyte donation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002;**16**:277-291.

Kol S, Lightman A, Hillensjo T, Devroey P, Fauser B, Tarlatzis B, Mannaerts B and Istkovitz-Eldor J. High doses of gonadotrophin-releasing hormone antagonist in in-vitro fertilization cycles do not adversely affect the outcome of subsequent freeze-thaw cycles. *Human Reproduction* 1999;**14**:2242-2244.

Kolibianakis EM, Papanikolaou EG, Camus M, Tournaye H, Van Steirteghem AC and Devroey P. Effect of oral contraceptive pill pretreatment on ongoing pregnancy rates in patients stimulated with GnRH antagonists and recombinant FSH for IVF. A randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2006;**21**:352-357.

Kolibianakis EM, Schultze-Mosgau A, Schroer A, van Steirteghem A, Devroey P, Diedrich K and Griesinger G. A lower ongoing pregnancy rate can be expected when GnRH agonist is used for triggering final oocyte maturation instead of HCG in patients undergoing IVF with GnRH antagonists. *Hum Reprod* 2005;**20**:2887-2892.

Landecker H. Microcinematography and the history of science and film. *ISIS-BALTIMORE ETC*- 2006;**97**:121.

Levi-Setti PE, Cavagna M, Baggiani A, Zannoni E, Colombo GV and Liprandi V. FSH and LH together in ovarian stimulation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;**115 Suppl 1**:S34-9.

Leyendecker G, Wildt L and Hansmann M. Pregnancies following chronic intermittent (pulsatile) administration of Gn-RH by means of a portable pump ("Zyklomat")--a new approach to the treatment of infertility in hypothalamic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;**51**:1214-1216.

Lonergan P, Khatir H, Piumi F, Rieger D, Humblot P and Boland MP. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J Reprod Fertil* 1999;**117**:159-167.

Lundin K, Bergh C and Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod* 2001;**16**:2652-2657.

Lunenfeld B, Van Steirteghem A and Bertarelli Foundation. Infertility in the third millennium: implications for the individual, family and society: condensed meeting report from the Bertarelli Foundation's second global conference. *Hum Reprod Update* 2004;**10**:317-326.

Macklon NS, Stouffer RL, Giudice LC and Fauser BC. The science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Endocr Rev* 2006;**27**:170-207.

Magda Teresa Ruiz-Salguero. Aspectos demograficos de la infecundidad, la infertilidad y la esterilidad en Espana 2001:.

Manipalviratn S, DeCherney A and Segars J. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2009;**91**:305-315.

Mannaerts B and Gordon K. Embryo implantation and GnRH antagonists: GnRH antagonists do not activate the GnRH receptor. *Human Reproduction* 2000;**15**:1882-1883.

Manno M, Cervi M, Zadro D, Fuggetta G, Adamo V and Tomei F. Different ART outcomes at increasing peak estradiol levels with long and antagonist protocols: retrospective insights from ten years experience. *J Assist Reprod Genet* 2011:.

McDonald E. A global perspective on infertility: an under recognized public health issue. *Carolina Papers* 2004;**18**.

McKiernan SH and Bavister BD. Timing of development is a critical parameter for predicting successful embryogenesis. *Hum Reprod* 1994;**9**:2123-2129.

McNatty KP, Makris A, Reinhold VN, De Grazia C, Osathanondh R and Ryan KJ. Metabolism of androstenedione by human ovarian tissues in vitro with particular reference to reductase and aromatase activity. *Steroids* 1979;**34**:429-443.

Melo M, Busso CE, Bellver J, Alama P, Garrido N, Meseguer M, Pellicer A and Remohi J. GnRH agonist versus recombinant HCG in an oocyte donation programme: a randomized, prospective, controlled, assessor-blind study. *Reprod Biomed Online* 2009a;**19**:486-492.

Melo MA, Garrido N, Alvarez C, Bellver J, Meseguer M, Pellicer A and Remohi J. Antral follicle count (AFC) can be used in the prediction of ovarian response but cannot predict

the oocyte/embryo quality or the in vitro fertilization outcome in an egg donation program. *Fertil Steril* 2009b;**91**:148-156.

Mercan R, Mayer JF, Walker D, Jones S, Oehninger S, Toner JP and Muasher SJ. Improved oocyte quality is obtained with follicle stimulating hormone alone than with follicle stimulating hormone/human menopausal gonadotrophin combination. *Hum Reprod* 1997;**12**:1886-1889.

Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing N and Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011:1-14.

Messinis IE, Messini CI and Dafopoulos K. The role of gonadotropins in the follicular phase. *Ann N Y Acad Sci* 2010;**1205**:5-11.

Millar R, Lowe S, Conklin D, Pawson A, Maudsley S, Troskie B, Ott T, Millar M, Lincoln G, Sellar R *et al.* A novel mammalian receptor for the evolutionarily conserved type II GnRH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**:9636-9641.

Minaretzis D, Alper MM, Oskowitz SP, Lobel SM, Mortola JF and Pavlou SN. Gonadotropin-releasing hormone antagonist versus agonist administration in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation: cycle performance and in vitro steroidogenesis of granulosa-lutein cells. *Am J Obstet Gynecol* 1995;**172**:1518-1525.

Moor RM and Trounson AO. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fertil* 1977;**49**:101-109.

Nagy ZP, Sakkas D and Behr B. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Non-invasive assessment of embryo viability by metabolomic profiling of culture media ('metabolomics'). *Reprod Biomed Online* 2008;**17**:502-507.

Nakahara T, Iwase A, Goto M, Harata T, Suzuki M, Ienaga M, Kobayashi H, Takikawa S, Manabe S, Kikkawa F *et al.* Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos. *J Assist Reprod Genet* 2010;**27**:93-96.

Nayudu PL, Vitt UA, Barrios De Tomasi J, Pancharatna K and Ulloa-Aguirre A. Intact follicle culture: what it can tell us about the roles of FSH glycoforms during follicle development. *Reprod Biomed Online* 2002;**5**:240-253.

Neuber E, Mahutte NG, Arici A and Sakkas D. Sequential embryo assessment outperforms investigator-driven morphological assessment at selecting a good quality blastocyst. *Fertil Steril* 2006;**85**:794-796.

Oktaý K, Turkcuoglu I and Rodriguez-Wallberg KA. GnRH agonist trigger for women with breast cancer undergoing fertility preservation by aromatase inhibitor/FSH stimulation. *Reprod Biomed Online* 2010;**20**:783-788.

Olivennes F, Alvarez S, Bouchard P, Fanchin R, Salat-Baroux J and Frydman R. The use of a GnRH antagonist (Cetrorelix) in a single dose protocol in IVF-embryo transfer: a dose finding study of 3 versus 2 mg. *Hum Reprod* 1998;**13**:2411-2414.

Palermo G, Joris H, Devroey P and Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;**340**:17-18.

Papageorgiou T, Guibert J, Goffinet F, Patrat C, Fulla Y, Janssens Y and Zorn JR. Percentile curves of serum estradiol levels during controlled ovarian stimulation in 905 cycles stimulated with recombinant FSH show that high estradiol is not detrimental to IVF outcome. *Hum Reprod* 2002;**17**:2846-2850.

Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL and Conti M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 2004;**303**:682-684.

Patrizio P and Sakkas D. From oocyte to baby: a clinical evaluation of the biological efficiency of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2009;**91**:1061-1066.

Payne D, Flaherty SP, Barry MF and Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod* 1997;**12**:532-541.

Pellicer A, Ruiz A, Castellvi RM, Calatayud C, Ruiz M, Tarin JJ, Miro F and Bonilla-Musoles F. Is the retrieval of high numbers of oocytes desirable in patients treated with

gonadotrophin-releasing hormone analogues (GnRHa) and gonadotrophins?. *Hum Reprod* 1989a;**4**:536-540.

Pellicer A, Simon C, Miro F, Castellvi RM, Ruiz A, Ruiz M, Perez M and Bonilla-Musoles F. Ovarian response and outcome of in-vitro fertilization in patients treated with gonadotrophin-releasing hormone analogues in different phases of the menstrual cycle. *Hum Reprod* 1989b;**4**:285-289.

Pena JE, Chang PL, Chan LK, Zeitoun K, Thornton MH, Sauer MV. Supraphysiological estradiol levels do not affect oocyte and embryo quality in oocyte donation cycles. *Hum Reprod* 2002;**17**:83-87.

Prados N, Crespo M, Hernaez MJ, Ruiz M, Gacia J, Vime P, Calderon G and Fernandez-Sanchez M. Criterios de seleccion embrionaria. In Manual Pratico de Esterilidad y Reproduccion Humana. El Laboratorio de Reproduccion Asistida. 2008. McGraw-Hill/Interamericana, pp. 201.

Pribenszky C, Losonczy E, Molnar M, Lang Z, Matyas S, Rajczy K, Molnar K, Kovacs P, Nagy P, Conceicao J *et al.* Prediction of in-vitro developmental competence of early cleavage-stage mouse embryos with compact time-lapse equipment. *Reprod Biomed Online* 2010;**20**:371-379.

Raga F, Casan EM, Kruessel J, Wen Y, Bonilla-Musoles F and Polan ML. The role of gonadotropin-releasing hormone in murine preimplantation embryonic development. *Endocrinology* 1999;**140**:3705-3712.

Rubio C, Mercader A, Alama P, Lizan C, Rodrigo L, Labarta E, Melo M, Pellicer A and Remohi J. Prospective cohort study in high responder oocyte donors using two hormonal stimulation protocols: impact on embryo aneuploidy and development. *Hum Reprod* 2010;**25**:2290-2297.

Ruiz A, Romero JL, De los Santos MJ, Rubio C, Minguez Y, Duque B, Garcia-Velasco JA, Pellicer A and Remohi J. La fecundacion in vitro (FIV) en el laboratorio de Reproduccion Asistida: optimizacion de los resultados. In Reproduccion Humana. 1996. McGraw-Hill/Interamericana, pp. 337.

Sakkas D, Percival G, D'Arcy Y, Sharif K and Afnan M. Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril* 2001;**76**:1150-1156.

Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnens D, Bianchi PG and Campana A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod* 1998;**13**:182-187.

Salihu HM, Shumpert MN, Slay M, Kirby RS and Alexander GR. Childbearing beyond maternal age 50 and fetal outcomes in the United States. *Obstet Gynecol* 2003;**102**:1006-1014.

Santos MA, Kuijk EW and Macklon NS. The impact of ovarian stimulation for IVF on the developing embryo. *Reproduction* 2010;**139**:23-34.

Scott L, Alvero R, Leondires M and Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* 2000;**15**:2394-2403.

Seli E, Robert C and Sirard MA. OMICS in assisted reproduction: possibilities and pitfalls. *Mol Hum Reprod* 2010;**16**:513-530.

Shimada M and Terada T. FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells: a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes. *Mol Hum Reprod* 2002;**8**:612-618.

Shoham Z. The clinical therapeutic window for luteinizing hormone in controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril* 2002;**77**:1170-1177.

Shoham Z, Jacobs HS and Insler V. Luteinizing hormone: its role, mechanism of action, and detrimental effects when hypersecreted during the follicular phase. *Fertil Steril* 1993;**59**:1153-1161.

Simon C, Gutierrez A, Vidal A, de los Santos MJ, Tarin JJ, Remohi J and Pellicer A. Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation. *Hum Reprod* 1994;**9**:725-729.

Sluder G and Wolf DE. Digital Microscopy. In Elsevier (ed) . 2003.

Smitz J, Andersen AN, Devroey P, Arce JC and MERIT Group. Endocrine profile in serum and follicular fluid differs after ovarian stimulation with HP-hMG or recombinant FSH in IVF patients. *Hum Reprod* 2007;**22**:676-687.

Soares SR, Troncoso C, Bosch E, Serra V, Simon C, Remohi J and Pellicer A. Age and uterine receptiveness: predicting the outcome of oocyte donation cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;**90**:4399-4404.

Soares SR, Velasco JA, Fernandez M, Bosch E, Remohi J, Pellicer A and Simon C. Clinical factors affecting endometrial receptiveness in oocyte donation cycles. *Fertil Steril* 2008;**89**:491-501.

Tarlatzis BC, Fauser BC, Kolibianakis EM, Diedrich K, Rombauts L and Devroey P. GnRH antagonists in ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod Update* 2006;**12**:333-340.

Terriou P, Giorgetti C, Hans E, Salzmann J, Charles O, Cignetti L, Avon C and Roulier R. Relationship between even early cleavage and day 2 embryo score and assessment of their predictive value for pregnancy. *Reprod Biomed Online* 2007;**14**:294-299.

Tesarik J and Mendoza C. Nongenomic effects of 17 beta-estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;**80**:1438-1443.

The Ganirelix Dose-finding Study Group. A double-blind, randomized, dose-finding study to assess the efficacy of the gonadotrophin-releasing hormone antagonist ganirelix (Org 37462) to prevent premature luteinizing hormone surges in women undergoing ovarian stimulation with recombinant follicle stimulating hormone (Puregon). *Human reproduction* 1998;**13**:3031.

Trounson A, Leeton J, Besanko M, Wood C and Conti A. Pregnancy established in an infertile patient after transfer of a donated embryo fertilised in vitro. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;**286**:835-838.

Ubaldi F, Camus M, Smitz J, Bennink HC, Van Steirteghem A and Devroey P. Premature luteinization in in vitro fertilization cycles using gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH-

a) and recombinant follicle-stimulating hormone (FSH) and GnRH-a and urinary FSH. *Fertil Steril* 1996;**66**:275-280.

Van der Auwera I and D'Hooghe T. Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum Reprod* 2001;**16**:1237-1243.

van der Gaast MH, Eijkemans MJ, van der Net JB, de Boer EJ, Burger CW, van Leeuwen FE, Fauser BC and Macklon NS. Optimum number of oocytes for a successful first IVF treatment cycle. *Reprod Biomed Online* 2006;**13**:476-480.

Van Montfoort AP, Dumoulin JC, Kester AD and Evers JL. Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Hum Reprod* 2004;**19**:2103-2108.

Van Wely M, Westergaard LG, Bossuyt PMM, Van der Veen F. Human menopausal gonadotropin versus recombinant follicle stimulation hormone for ovarian stimulation in assisted reproductive cycles (Review). *Cochrane Database of Systematic reviews* 2003:.

Van Wely M, Westergaard LG, Bossuyt PMM and Van der Veen F. Human menopausal gonadotropin versus recombinant follicle stimulation hormone for ovarian stimulation in assisted reproductive cycles (Review). *The Cochrane Library* 2008:.

Venetis CA, Kolibianakis EM, Tarlatzi TB and Tarlatzis BC. Benefits of luteinizing hormone activity in ovarian stimulation for IVF. *Reprod Biomed Online* 2009;**18 Suppl 2**:31-36.

Weghofer A, Munne S, Brannath W, Chen S, Tomkin G, Cekleniak N, Garrisi M, Barad D, Cohen J and Gleicher N. The impact of LH-containing gonadotropins on diploidy rates in preimplantation embryos: long protocol stimulation. *Hum Reprod* 2008;**23**:499-503.

Weissman A, Meriano J, Ward S, Gotlieb L and Casper RF. Intracytoplasmic sperm injection after follicle stimulation with highly purified human follicle-stimulating hormone compared with human menopausal gonadotropin. *J Assist Reprod Genet* 1999;**16**:63-68.

Westergaard LG, Laursen SB and Andersen CY. Increased risk of early pregnancy loss by profound suppression of luteinizing hormone during ovarian stimulation in normogonadotrophic women undergoing assisted reproduction. *Hum Reprod* 2000;**15**:1003-1008.

Whitacre, KS, Seifer, DB, Friedman, CI, Coskun S, Kenard KA, Kim MH, Alak, BM. Effects of ovarian source, patients age and menstrual cycle phase on in vitro maturation of immature human oocytes. *Fertil Steril* 1998;**70**:1015-1021.

Yding Andersen C. Effect of FSH and its different isoforms on maturation of oocytes from pre-ovulatory follicles. *Reprod Biomed Online* 2002;**5**:232-239.

Younis JS, Simon A and Laufer N. Endometrial preparation: lessons from oocyte donation. *Fertil Steril* 1996;**66**:873-884.

Zelinski-Wooten MB, Chandrasekher YA and Stouffer RL. Duration, amplitude and specificity of the midcycle gonadotropin surge in nonhuman primates. In New york: Springer-verlag (ed) Ovulation. evolving scientific and clinical concepts. 2000, pp. 98-109.

Ziebe S, Bangsboll S, Schmidt KL, Loft A, Lindhard A and Nyboe Andersen A. Embryo quality in natural versus stimulated IVF cycles. *Hum Reprod* 2004;**19**:1457-1460.

Ziebe S, Lundin K, Janssens R, Helmgaard L, Arce JC and MERIT (Menotrophin vs Recombinant FSH in vitro Fertilisation Trial) Group. Influence of ovarian stimulation with HP-hMG or recombinant FSH on embryo quality parameters in patients undergoing IVF. *Hum Reprod* 2007;**22**:2404-2413.